UNTERSUCHUNGEN ZUR HERSTELLUNG ARTIFIZIELLER MANGELPLASMEN FÜR DIE EINSTUFEN – BESTIMMUNG DER FAKTOREN II, VII UND X

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt von

RUPPRECHT WILLIBALD KULZER

aus München

BONN 1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546506_0001

UNTERSUCHUNGEN ZUR HERSTELLUNG ARTIFIZIELLER MANGELPLASMEN FÜR DIE EINSTUFEN – BESTIMMUNG DER FAKTOREN II, VII UND X

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

RUPPRECHT WILLIBALD KULZER
aus München

BONN 1980

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Beeser

2. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Schander

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Bluttransfusionswesen
der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. H. Egli

Druck: M. Wehle 5305 Witterschlick

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	8
2	Hypothesen des Gerinnungsablaufs	11
3	Eigenschaften und biochemische Reaktionen der Faktoren II, VII, X und des Gewebsfaktors	18
3.1	Eigenschaften der Faktoren II, VII und X	18
3.1.1	Biochemische und physikochemische Eigenschaften	18
3.1.1.1	Spezifische Eigenschaften	18
3.1.1.2	Gemeinsame Eigenschaften	21
3.1.2	Physiologie der Faktoren II, VII, X	23
3.1.3	Pathophysiologie	26
3.2	Eigenschaften des Gewebsfaktors	30
3.3	Die Aktivierung der Faktoren VII, X, II während des Gerinnungsablaufs	32
4	Bestimmungsmethoden	39
4.1	Übersicht	39
4.2	Prinzip der Einstufen-Methoden	41
4.3	Bekannte Einstufen-Methoden zur Bestimmung der Faktoren II, VII und X	42
5	Eigene Untersuchungen	51
5.1	Material und Methoden	51
5.2	Orientierende Versuche	56
5.2.1	Versuche mit Humanplasma	56
5.2.2	Versuche mit Schafsplasma	73
5.2.3	Versuche mit Pferdeplasma	75
5.2.4	Versuche mit Rinderplasma	76
5.2.5	Versuche mit Schweineplasma	77
5.2.6	Zusammenfassung der orientierenden Versuche	83
5.3	Versuche zur Herstellung eines Faktor VII-Mangelplasmas	86
5.3.1	Versuche unter Verwendung von humanen Plasmafraktionen und $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma	86

		Seite
5.3.2	Versuche unter Verwendung von Fraktionen aus Schweineplasma und von asbestfiltriertem Rinderplasma	89
5.4	Herstellung eines Faktor II-Mangelplasmas aus Rinderplasma	93
5.5	Herstellung eines Faktor X-Mangelplasmas aus Schweineplasma	98
5.5.1	Entwicklung der Präparationsmethode	98
5.5.1.1	Auswahl des günstigsten pH-Bereichs und des Ionenaustauschers	98
5.5.1.2	Herstellung großer Chargen	105
5.5.1.3	Einfluß der Dialyse auf die Qualität des Mangelplasmas	109
5.5.1.4	Vorschrift für die routinemäßige Herstellung von Schweine-Faktor X-Mangelplasma	112
5.5.2	Eigenschaften des Schweine-Faktor X-Mangelplasmas	114
5.5.2.1	Gehalt an Gerinnungsfaktoren des Extrinsic Systems	114
5.5.2.2	Bestimmung der Faktor X-Restaktivität mit humanen kongenitalen Faktor X-Mangelplasmen	115
5.5.2.3	Reproduzierbarkeit des Herstellungsverfahrens	116
5.5.3	Verwendung des Schweinesubstratplasmas für Faktor X-Einstufenmethoden	119
5.5.3.1	Spezifität	119
5.5.3.2	Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen der Faktor X-Aktivität	120
5.5.3.3	Einfluß verschiedener thromboplastischer Aktivatoren	120
5.5.3.4	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Faktor X-Schweinesubstratplasma-Methode	126
5.5.3.4.1	Mehrfachbestimmungen im Plasma	126
5.5.3.4.2	Lagerungsstabilität des Mangelplasmas bei -40°C	127
5.5.3.4.3	Stabilität des tiefgefrorenen Mangelplasmas nach dem Wiederauftauen	127

Seite

5.5.3.5 Vergleichende Bestimmung der Faktor X-Aktivität in Patientenplasmen unter Verwendung von Schweinemangel-, Rindermangel- und humanem kongenitalen Mangelplasma 130

6 Besprechung der Ergebnisse 136

7 Zusammenfassung 148

8 Literatur 151

1 Einleitung

Wird ein Blutgefäß verletzt, so sind an der anschließenden Blutstillung eine Vielzahl von Mechanismen beteiligt, die im wesentlichen drei Funktionsbereichen angehören: dem Gefäßsystem (Kontraktion der Gefäßwand, Endothelverklebung, Freisetzung der Aktivatoren u.a.), den Thrombozyten (Adhäsion, Aggregation, Freisetzung von Aktivatoren) und dem plasmatischen Gerinnungssystem (Aktivierung der endogenen und exogenen Gerinnung).

Die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems verläuft über eine Reihe von aufeinanderfolgenden Reaktionen der Gerinnungsfaktoren unter Beteiligung von Phospholipiden aus den Thrombozyten bzw. Gewebssaft; von diesen Reaktionen ist nur die Entstehung des Fibrins aus dem Fibrinogen, die nahezu am Ende der Reaktionskette stattfindet, mit bloßem Auge als Gerinnselbildung zu erfassen. Entsprechend war das Fibrin (der Faserstoff) auch als erstes Protein des plasmatischen Gerinnungssystems Gegenstand gerinnungsphysiologischer Untersuchungen.

Johannes MÜLLER konnte 1832 Froschplasma durch Filtration von den korpuskulären Bestandteilen des Blutes trennen und durch die nachfolgende Gerinnung des Plasmas die BERZELIUS'sche Theorie beweisen "daſs beim Gerinnen des Blutes der im Blut aufgelöste Faserstoff fest werde und die Blutkörperchen zwischen sich nehme" (196: S. 537 - 542).

Während MÜLLER noch keine Angaben über die Herkunft des Fibrins machte, vermutete R. VIRCHOW, daß "in keiner der normalen thierischen Flüssigkeiten der Faserstoff als solcher präexistiert, daß vielmehr das Blut (und die Lymphe) Vorstufen..... desselben enthalten, welche unter dem Contact des Sauerstoffs schneller oder langsamer in wirklichen Faserstoff übergehen und dann gerinnen" (286).

Die Arbeiten von A. SCHMIDT und O. HAMMARSTEN zeigen dann, daß dieser Übergang durch ein Ferment verursacht wird (246, Literaturübersicht bei MORAWITZ 1905, 192).

Im Jahre 1905 veröffentlichte P. MORAWITZ (192) seine als "klassisch" bezeichnete Theorie, nach der die bei "Berührung mit Fremdkörpern" aus Zellen freigesetze "Thrombokinase" mit dem "Thrombogen (= Prothrombin) und den Kalksalzen zusammen Thrombin" bildet; dieses Thrombin wandelt dann ohne Mitwirkung der "Kalksalze" Fibrinogen in Fibrin um.

Über drei Jahrzehnte wurden die vier Faktoren von MORAWITZ (Fibrinogen, Prothrombin, Thrombokinase, Kalziumionen) als die einzigen Faktoren des Gerinnungssystems angesehen; dies nicht zuletzt, weil geeignete Untersuchungsmethoden fehlten.

Den ersten Hinweis auf das Vorhandensein weiterer Gerinnungsfaktoren gab QUICK (231) im Jahre 1935 mit der Beschreibung seiner Methode zur Messung der Prothrombinkonzentration. Er stellte dabei fest, daß der Gerinnungsdefekt bei der Hämophilie nicht auf einer Veränderung der Prothrombinqualität oder -quantität beruht und führte damals die Hämophilie auf einen Thrombokinasedefekt zurück.

In der folgenden Zeit wurde bis zum heutigen Tage bei der Untersuchung von Patienten mit einer angeborenen Blutungsneigung immer wieder festgestellt, daß manchen Patienten ein bisher unbekannter Gerinnungsfaktor fehlte, der offensichtlich für den normalen Ablauf der Gerinnung ebenfalls erforderlich ist. Durch in vitro Mischversuche mit Plasmen von Patienten, deren Gerinnungsdefekt bereits definiert war, konnte dann der neu aufgetretene Defekt als bisher unbekannt charakterisiert werden.

Der erste Gerinnungsfaktor, der auf diese Weise von OWREN im Jahre 1946 beschrieben wurde, war der Faktor V (217). Erste Hinweise auf die Existenz des Faktors VII gab OWREN im Jahre 1949 (297); DE VRIES, ALEXANDER, GOLDSTEIN erkannten die erhöhte Aktivität des Faktors VII im Serum, indem sie den Serum Prothrombin Conversion Accelerator (SPCA) beschrieben (7, 289). Eine besondere Eigenschaft des Faktors VII, die GJØNNAESS 1972 als die kälteinduzierte Aktivierung des Faktors VII charakterisierte, wurde bereits 1949 von ALEXANDER und LANDWEHR (6) erkannt. KOLLER und Mitarbeiter (150) konnten schließlich 1951 Prothrombin und F. VII durch Asbestfiltration voneinander trennen und Einstufen-Methoden zur Bestimmung beider Faktoren angeben (s.S. 44, 52). Im selben und in den folgenden Jahren wurden eine Reihe von Fällen mit einem angeborenen Faktor-VII-Mangel beschrieben (3, 5, 143, 165, 174). Darunter befanden sich jedoch auch Fälle, die sich nachträglich als Faktor-X-Mängel herausstellten (15, 16, 165, 275); die Differentialdiagnose gelang einmal mit Hilfe der oben erwähnten Mischversuche, zum andern mit dem Thrombokinasebildungstest von BIGGS und DOUGLAS (28) sowie mit Einstufen-Tests unter Verwendung des Giftes der Vipera Russelli, bei deren Anwendung sich nur bei einem Faktor-X-Mangel pathologische Werte ergaben (15, 17, 275).

Damit waren alle Faktoren bekannt, die zum sogenannten Extrinsic-System (s.S. 14) gehören. Nur wenig später wurden auch die Faktoren des Intrinsic-Systems XII, XI, IX, VIII (s.S. 14) beschrieben.

Wesentliche Voraussetzung für die Abgrenzung der Faktoren, insbesondere für die Labordiagnose von Aktivitätsänderungen der einzelnen Faktoren, sind leistungsfähige spezifische Labormethoden. Die sogenannten Einstufen-Methoden (s. Abschnitt 4) der Faktoren II, VII und X sind als spezifische Modifikationen der von QUICK im Jahre 1935 beschriebenen Prothrombinzeitbestimmung anzusehen. Diese Modifikationen werden erreicht durch Zusatz eines Plasmas mit vollständigem isolierten Mangel des zu prüfenden Gerinnungsfaktors (Mangelplasma) zum Reaktionsgemisch der Prothrombinzeitbestimmung nach QUICK. Die Korrektur des Gerinnungsdefektes im Mangelplasma durch das Patientenplasma bzw. Probenmaterial ist dann ein Maß für die Konzentration des betreffenden Gerinnungsfaktors im Probenmaterial. Die Berechnung der Konzentration bzw. der Aktivität des Gerinnungsfaktors erfolgt anschließend mit Hilfe einer Bezugskurve.

Für die Durchführung von Aktivitätsbestimmungen mit Einstufen-Methoden wird somit Plasma mit einem isolierten, vollständigen Faktordefekt (Mangel- oder Substratplasma) benötigt. Wegen der Seltenheit von isolierten angeborenen Faktordefekten stehen jedoch natürliche Mangelplasmen nicht in ausreichendem Maße für Routinebestimmungen zur Verfügung. Man ist deshalb darauf angewiesen, Plasmen mit einem isolierten Faktordefekt künstlich herzustellen, indem der betreffende Gerinnungsfaktor entweder inaktiviert oder durch verschiedene Trennverfahren aus dem Plasma entfernt wird.

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe chromatographischer Methoden, vorwiegend unter Verwendung von DEAE-Ionenaustauschern, einfache Verfahren zur Herstellung von Mangelplasmen aus menschlichen und tierischen Plasmen für die Einstufen-Bestimmung der Faktoren II, VII und X zu entwickeln.

2 Hypothesen des Gerinnungsablaufs

Mit der Entdeckung weiterer Gerinnungsfaktoren mußte die klassische Vierfaktoren-Theorie von MORAWITZ modifiziert werden. Von den im Laufe der letzten 30 Jahre entwickelten Vorstellungen über den Gerinnungsablauf erlangten zwei einander völlig entgegengesetzte Theorien besondere Bedeutung:

1964 veröffentlichen DAVIE und RATNOFF (46) und MACFARLANE (176) fast gleichzeitig eine Hypothese, nach der in einer Kettenreaktion die als Proenzyme im Plasma vorliegenden Faktoren XII, XI, IX, VIII, X, V, II jeweils durch die aktivierten Vorgänger in der Reaktionskette in die aktiven Enzyme umgewandelt werden sollten. Wegen der postulierten Kettenreaktionen wurden diese Hypothesen von ihren Autoren als "enzyme cascade" oder "waterfall sequence" bezeichnet. Die Funktion des Faktors VII wurde zunächst in beiden Hypothesen nicht diskutiert.

Eine zweite Hypothese wurde im wesentlichen von SEEGERS und Mitarbeitern entwickelt. Während die Wasserfall-Theorie auf der Annahme basierte, jeder Gerinnungsfaktor stelle ein eigenständiges Proenzym dar, ging SEEGERS davon aus, daß die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems über ein komplexes Prothrombinmolekül autokatalytisch abläuft. Der Entwicklung dieser Hypothese lag das in vitro beobachtete Reaktionsverhalten von gereinigten Prothrombinpräparationen zugrunde, die nach SEEGERS Ansicht nur eine einzige Molekülspezies, nämlich Prothrombin enthielten (251: S. 24, 25). Aus diesem Prothrombin entstanden im Verlauf der Aktivierung als Autoprothrombine bezeichnete Prothrombin-Metaboliten, die wiederum eigene enzymatische Aktivität entwickelten (183, 250, 251, 252). Übertragen auf die Verhältnisse der Thrombinbildung in vivo entstand eine Hypothese des Gerinnungsablaufs, in der die Dissoziation des Prothrombinmoleküls und die anschließende Autokatalyse eine zentrale Rolle einnahmen und die übrigen Gerinnungsfaktoren als Kofaktoren angesehen wurden (247, 248: S. 316, 252).

Dieses Gerinnungsmodell wurde unter der Voraussetzung entwickelt, daß in den Prothrombinpräparaten vor der Aktivierung außer Prothrombinmolekülen keine anderen Gerinnungsaktivitäten vorhanden seien. Diese Annahme wurde durch die Ergebnisse der damaligen, relativ groben Methoden zur Proteinanalyse (Elektrophorese, Ultrazentrifugation, Endgruppenanalyse) (251: S. 25) gestützt (70: S. 43). Heute ist bekannt, daß derartige Prothrombinpräparationen von SEEGERS auch andere eng verwandte Gerinnungsaktivitäten (VII, X)

des sogenannten Prothrombin-Komplexes enthielten (22, 23), die damals wegen ihrer dem Prothrombin sehr ähnlichen physikochemischen Eigenschaften, der teilweise homologen Aminosäuresequenz (s.S. 21) und der gegenüber Prothrombin hohen spezifischen Aktivität (Bindung hoher Aktivität an Spuren von Trägerprotein) (70: S. 43) nicht erfaßt wurden.

Nach den zur Zeit gültigen Vorstellungen werden alle Gerinnungsfaktoren als eigenständige Proteine angesehen, wobei allerdings über die Eigenständigkeit des Faktors IX noch unterschiedliche Meinungen vertreten werden (s.u.). Dabei besitzen nicht alle Faktoren enzymatische Aktivität: Das High Molecular Weight Kininogen (HMWK), Faktor VIII und Faktor V sind Kofaktoren, die die Geschwindigkeit und/oder die Spezifität der enzymatischen Reaktionen beeinflussen. Die Aktivierung des als Intrinsic System bezeichneten Teils (s.u.) des plasmatischen Gerinnungssystems beginnt mit der Aktivierung des Hageman-Faktors, sobald dieser mit einer intimafremden benetzbaren Oberfläche in Kontakt kommt; außerdem beginnt damit gleichzeitig die Hageman-Faktor-abhängige Aktivierung des kininbildenden und des fibrinolytischen Systems (110, 181).

Die Oberflächenaktivierung des Faktors XII zu Faktor XII_a erfolgt nach Ansicht von GRIFFIN (112) nicht allein durch die Bindung des Hageman-Faktors an die Oberfläche.

Nach MEIER und Mitarb. (189) sowie GRIFFIN (112, 113) bewirkt die Bindung des Faktors XII an die Oberfläche lediglich eine Konformationsänderung des Faktor XII-Moleküls, die eine stark erhöhte Aktivierbarkeit dieses Gerinnungsfaktors durch Enzyme, insbesondere Plasma-Kallikrein, zur Folge hat. Damit bleibt weiterhin unklar, wie die Hageman-Faktor-abhängige Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems in Gang gesetzt wird. Die oben erwähnten Autoren halten eine Aktivierung des oberflächengebundenen Faktors XII durch Spuren von im Plasma zirkulierenden aktivierten Enzymen, z.B. Plasmin oder Plasmakallikrein, für möglich. Ist der an die Oberfläche gebundene Faktor XII einmal aktiviert, kann er sowohl Faktor XI als auch Plasma-Prekallikrein (Fletcher-Faktor) aktivieren. In einem positiven Feedback-Mechanismus aktiviert das Plasmakallikrein weitere Moleküle des an die Oberfläche gebundenen Faktors XII (38, 298), worauf eine schnelle Aktivierung des Intrinsic-Systems erfolgt. Bei allen diesen Reaktionen wirkt das HMWK, das an die benetzbare Oberfläche bzw. im Plasma abwechselnd an den Fletcher-Faktor oder an Faktor XI gebunden ist, als Kofaktor, der die Reaktionen beschleunigt; die Bindung des HF an die Oberfläche wird dadurch jedoch nicht beeinflußt (38,

168, 189, 238, 245, 276).

Aus dem Hageman-Faktor können neben dem Faktor XII_a durch Proteolyse die sogenannten Hageman-Faktor-Fragmente ($F.XII_f$) entstehen. Sie sind, ebenso wie eine von REVAK und Mitarb. (298) beschriebene Form des aktivierten Hageman-Faktors β-Hf_a, nicht an die aktivierende Oberfläche gebunden. Ihre enzymatische Aktivität bewirkt, wie dies auch schon von COCHRANE und WUEPPER (43) im Jahre 1971 beschrieben wurde, eher eine Aktivierung des kininbildenden als des Gerinnungssystems (181). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf eine Darstellung des Faktors XII_f in Abb. 1 verzichtet.

Kallikrein spaltet vom HMWK außer Bradykinin noch ein "Peptid 1 · 2" ab, das mit Bradykinin synergistisch auf die Gefäßpermeabilität wirkt (186); ob nach der Abspaltung des Kinins durch Kallikrein oder andere Enzyme das Kininogen noch einen gerinnungsfördernden Effekt hat, wird von verschiedenen Untersuchern unterschiedlich beurteilt (38, 186, 242). Möglicherweise wurden verschiedene Formen des HMWK untersucht.

Die oben erwähnte, mit der Hageman-Faktor-Aktivierung einsetzende Aktivierung des fibrinolytischen Systems scheint auf mehreren Wegen möglich zu sein: Einmal kann das Kallikrein Plasminogen aktivieren (155, 84); das Kallikrein ist anscheinend mit dem schon vorher beschriebenen Plasminogen-Proaktivator identisch (282), obwohl KAPLAN und Mitarb. (146) dies nicht bestätigen konnten. Zum anderen können die aktivierten Faktoren XI und XII selbst das Plasminogen aktivieren. Welche von diesen Aktivierungsmöglichkeiten in vivo die größte Bedeutung hat, ist noch nicht geklärt (s. dazu auch S. 16).

Der aktivierte Faktor XI aktiviert Faktor IX in Gegenwart von Kalzium, wobei von Faktor IX ein Peptid abgespalten wird (56, 80). Die noch bestehenden Unklarheiten über die Herkunft des Faktors IX werden am Schluß dieses Abschnitts besprochen.

Faktor IX_a bildet mit Faktor VIII, Phospholipiden und Ca^{++} einen Komplex und aktiviert den Faktor X (80, 107, 214, 232, 270, 280).

Die Aktivierung des Prothrombins zu Thrombin erfolgt wieder durch einen Komplex, der aus Faktor V, Phospholipiden, Ca^{++} und Faktor X_a gebildet wird (20, 175, 218, 135). Das Phospholipid stammt, wenn die Gerinnung in vivo abläuft, vorwiegend von den Thrombozyten.

Die reaktionsbeschleunigende Wirkung der Kofaktoren VIII und V wird stark erhöht, wenn sie vorher durch Spuren von Thrombin "aktiviert" wurden (25, 44,

68, 90, 235). ESMON und Mitarb. (68) konnten zeigen, daß nur der thrombin-aktivierte Faktor V in der Lage ist, mit Prothrombin zu reagieren.

Dieser bisher beschriebene Reaktionsblauf wird als "Intrinsic System" der Thrombinbildung bezeichnet, weil alle an der Reaktion beteiligten Substanzen intravasal vorhanden sind. Als "Extrinsic System" wird eine Folge von Reaktionen bezeichnet, die mit einer Aktivierung des Faktors VII durch den Gewebsfaktor und einer Komplexbildung des Faktors VII_a mit Phospholipiden beginnt; man ging dabei von der Vorstellung aus, daß der Gewebsfaktor erst bei einer Verletzung des Gewebes, in dem er in hoher Konzentration vorhanden ist, mit dem Blut in Berührung kommt (296). Durch neuere Untersuchungen hat sich herausgestellt, daß Gewebsfaktor bei bestimmten pathologischen Zuständen auch von den Leukozyten freigesetzt werden kann (197, 229, 241).

Der Phospholipid-Faktor VII-Komplex aktiviert in Gegenwart von Kalziumionen den Faktor X (106, 202, 233, 294). Da sich der durch den Phospholipid-Faktor VII-Komplex aktivierte Faktor X_a nicht von dem Faktor X_a unterscheidet, der durch den Faktor IX_a-Faktor VIII-Phospholipid-Kalzium-Komplex aktiviert wurde (137), ist von diesem Reaktionsschritt an der Weg der "intrinsic"- und "extrinsic"-Thrombinbildung gleich.

Das Thrombin wandelt Fibrinogen durch Abspaltung von 2 Fibrinopeptiden A und B in Fibrinmonomere um; unter dem Einfluß des durch Thrombin aktivierten Faktors $XIII_a$ entsteht festes Fibrin (34).

Für die Verankerung des Fibrinnetzes mit dem lädierten Gewebe sorgt offensichtlich das bisher erst von zwei Arbeitsgruppen beschriebene Fibronectin (kälteunlösliches Globulin); seine Moleküle, die unter anderem von den Endothelzellen gebildet werden können und im physikochemischen Verhalten dem Faktor VIII ähnlich sind, vernetzen sich untereinander, mit Fibrin und mit Kollagen, wenn sie mit aktiviertem Faktor XIII in Berührung gekommen sind (134, 194, 195, 67).

In dem Gerinnungsschema der Abb. 1 sind nun keinesfalls alle Reaktionsmöglichkeiten der Gerinnungsfaktoren enthalten; wahrscheinlich kommen in der nächsten Zeit noch ein oder zwei Gerinnungsfaktoren dazu: So entdeckten CHAN und Mitarb. (37) einen zusätzlichen Potentiator bei der Aktivierung des Faktors XII und HOUGIE und Mitarb. (129) beschrieben mit dem Passovoy-Defekt das Fehlen eines Faktors, der ebenfalls mit keinem bisher bekannten Gerinnungsfaktor identisch ist. In diesem Schema ebenfalls nicht enthalten sind die

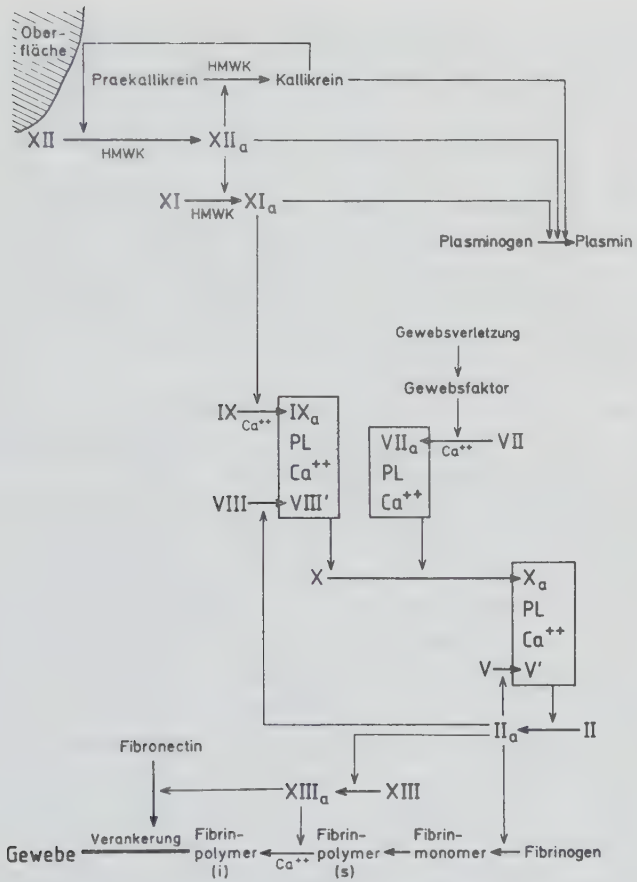


Abb. 1: Hypothese des Gerinnungsablaufs

Zeichenerklärung: PL = Phospholipid
HMWK = High Molecular Weight Kininogen
V´, VIII´ = durch Thrombin aktivierte Kofaktoren V, VIII
Fibrinpolymer (s) = lösliche Komplexe
Fibrinpolymer (i) = unlösliches Fibrin

F. XII$_{(f)}$ wurde nicht dargestellt (s.S. 13).

kälteinduzierte Aktivierung des Faktors VII, die bisher nur als in vitro-Phänomen beobachtet wurde und deren physiologische Bedeutung unklar ist, weiterhin die Aktivierung des Faktors VII durch das Intrinsic System und weitere Aktivierungsmöglichkeiten, die bei der Untersuchung der Aktivierung der Faktoren VII, X und II gefunden wurden (s.S. 32 - 38).

Bei der Interpretation der Ergebnisse solcher Untersuchungen muß überlegt werden, ob ein in vitro gewonnenes Resultat den Verhältnissen in vivo entspricht. Denn bei Untersuchungen mit rein dargestellten Faktoren ist es leicht möglich, daß eine Aktivierung oder eine Inhibition gefunden wird, die in vivo aufgrund einer Vielzahl von zusätzlichen direkt oder indirekt beteiligten Proteinen überhaupt keine Rolle spielt.

Auch über die Herkunft des Faktors IX bestehen noch Unklarheiten. In Abb. 1 wurde er zwar als eigenständiger Faktor dargestellt, die Möglichkeit der Entstehung aus dem Prothrombinmolekül ist jedoch denkbar:
EGLI und BUSCHA (63) sowie EGLI und SCHNEIDER (64) konnten zeigen, daß sich Faktor IX-Aktivität nur im Serum von Normalpersonen nachweisen läßt. Im Normalplasma sowie im Plasma und Serum von Hämophilie B-Patienten konnte kein Faktor IX nachgewiesen werden. Die Faktor IX-Aktivität ist in nicht aktiviertem Plasma so gering, daß ein solches Plasma als Substratplasma zur Bestimmung der Faktor IX-Aktivität anstelle von Hämophilie B-Plasma verwendet werden kann (64, 115).

Aufgrund dieser Resultate schlossen EGLI und SCHNEIDER eine Entstehung der Faktor IX-Vorstufe aus dem Prothrombin-Molekül entsprechend der SEEGERS'schen Theorie nicht aus. Unterstützung findet diese Vorstellung durch die Resultate von BEESER (22, 23) sowie von BEESER und EGLI (24), die mit rein dargestellten Prothrombinpräparaten, die insbesondere keine Faktor IX-Aktivität enthielten, eine Normalisierung des Gerinnungsdefektes von Hämophilie B-Plasma in vitro erreichen konnten.

Dagegen sprechen folgende Resultate für das Vorhandensein eines selbständigen Faktors IX als Proenzym im Plasma:
Der nicht aktivierte Faktor IX konnte aus bovinem und humanem Plasma isoliert werden (33, 55, 56, 65, 75, 279, 213); weiterhin konnten durch Immunisierung von Kaninchen monospezifische Antikörper gegen Faktor IX entwickelt werden. Diese Ergebnisse allein sind jedoch nicht ausreichend, da sich trotz der Gabe von Enzyminhibitoren zu den einzelnen Reinigungsschritten die Faktor IX-Akti-

vität aus dem Prothrombin durch Proteolyse hätte entwickeln können; bei dieser Proteolyse hätten neue antigene Determinanten entstehen können, gegen die der monospezifische Antikörper gerichtet sein könnte.

Die bisherigen Untersuchungen zur Strukturaufklärung des aus Plasma isolierten Faktor IX-Moleküls sprechen eher gegen eine Herkunft des Faktors IX aus dem Prothrombin-Molekül. Die bovinen und humanen Prothrombin- und Faktor IX-Moleküle zeigen eine ähnliche Struktur, wobei die kalziumbindenden Stellen am Aminoende des Moleküls sitzen, das aktive Zentrum am Carboxylende (33, 75) (s.S. 21). Der Kohlehydratgehalt beider Moleküle ist unterschiedlich (76). Die einander entsprechenden Regionen im Molekül beider Faktoren zeigen eine homologe, jedoch n i c h t identische Aminosäuresequenz (33, 55, 65, 75, 76, 80) über einen großen Molekülbereich.

Daraus läßt sich schließen, daß Faktor IX und Prothrombin zwei einander sehr ähnliche Moleküle sind. Sofern die Moleküle vor der Bestimmung der Aminosäuresequenz nicht denaturiert sind, wird eine Entstehung des Faktor IX-Moleküls aus dem Prothrombinmolekül nach diesen Ergebnissen in Frage gestellt, da dies eine Identität und nicht nur eine große Ähnlichkeit weiter Regionen in beiden Molekülen erfordern würde.

Wie diese gerinnungsphysiologischen und reaktionskinetischen Resultate mit den dazu in Widerspruch stehenden biochemischen Resultaten in Einklang zu bringen sind, muß sich erst noch zeigen.

3 Eigenschaften und biochemische Reaktionen der Faktoren II, VII, X und des Gewebsfaktors

Da die vorliegende Arbeit sich mit der Trennung der Gerinnungsfaktoren II, VII und X sowie der Bestimmung ihrer Aktivität in Einphasensystemen unter Verwendung von Gewebsthromboplastin befaßt, sollen im folgenden die Eigenschaften dieser Faktoren sowie des Gewebsfaktors und ihre biochemischen Reaktionen beim Ablauf der Gerinnung näher beschrieben werden.

3.1 Eigenschaften der Faktoren II, VII und X

3.1.1 Biochemische und physikochemische Eigenschaften

3.1.1.1 Spezifische Eigenschaften

Faktor II

Das Molekulargewicht von humanem und bovinem Prothrombin wird in der neueren Literatur ziemlich einheitlich mit 68 000 - 74 000 angegeben (20, 45, 62, 71, 118, 158, 182, 184, 216). Diese Werte wurden durch die Bestimmung des Sedimentationsgleichgewichtes und durch SDS-Gelelektrophorese erhalten.

Die Konzentration des Prothrombins im menschlichen Plasma beträgt 0.153mg/ml (257); die Konzentration im bovinen Plasma ist mit 0,1 - 0,15mg/ml (251) angegeben.

Prothrombin besteht aus einer Peptidkette (45, 179) und hat einen Kohlehydrat-Anteil von 11 - 14% (45, 119, 179).

Bei der Spaltung des bovinen Prothrombins in vitro durch Faktor X_a und auch durch Thrombin selbst entstehen Bruchstücke des Moleküls, aus deren Eigenschaften sich der Aufbau des Moleküls erkennen läßt.

Die aminoterminale Region des Prothrombins wird durch das Intermediate 3 (Synonyma: Prothrombinfragment 1, Fragment 1, F_A, PR-Fragment) gebildet. Es enthält 69% des Kohlehydrat-Anteils (35) und die stark Kalzium-bindenden Gruppen, die für die Bindung des Prothrombins an den Faktor X_a-Kalzium-Phospholipidkomplex verantwortlich sind (19, 20, 97, 180, 265, 266). Die Kalzium-Bindung des Prothrombins wird durch eine Aminosäure ermöglicht, die in biologischen Molekülen bisher nicht gefunden wurde: durch γ-Carboxylglutaminsäure

(201, 266). Sie ist in den Kalzium-bindenden Regionen des Prothrombins, des Faktors X, des Proteins C (s. Abschnitt 3.1.2) und mit größter Wahrscheinlichkeit auch in Faktor VII vorhanden (33, 66, 148, 149).

An dieses Bruchstück des Moleküls schließt sich das Intermediate 4 (Prothrombinfragment 2, Fragment 2, F_B, 3 - 6 Protein, O-Fragment) an. Es enthält wenig oder keine Kohlehydrate (35, 119); auf ihm sind die schwach Kalzium-bindenden Gruppen zu finden, die den Faktor V binden (19).

Das letzte Bruchstück ist das Intermediate 2 (Prethrombin 2) mit dem Carboxyl-Ende des Moleküls. Es enthält 33% der Kohlehydrate (35, 119) und ist der direkte Vorläufer des Thrombins (119, 184, 216).

DOWNING und Mitarb. (62) stellten bei ihren Untersuchungen über die Aktivierung von humanem Prothrombin fest, daß sich - mit einer Ausnahme - die Aktivierungsfragmente weder im Molekulargewicht noch in ihrer Aminosäurezusammensetzung von den bovinen Fragmenten (s.o.) unterscheiden. Daraus kann auf einen ähnlichen Aufbau des humanen Prothrombins geschlossen werden.

Faktor VII

Nach neueren Untersuchungen hat der Faktor VII aus bovinem Plasma ein Molekulargewicht von 53 000 - 54 000 (149, 233, 234). Das Molekulargewicht des humanen Faktors VII ist etwas größer: Mit Ultrazentrifuge und Gelfiltration fanden LAAKE und ELLINGSEN (153) sowie GLADHAUG und PRYDZ (106) Werte von 58 000 - 62 000. Das MG von Faktor VII, der aus menschlichem Serum isoliert wurde, ist niedriger; es wird mit 44 700 - 48 000 angegeben (106, 228). Menschlicher Faktor VII, der aus der Cohn'schen Fraktion III isoliert wurde, hatte ein MG von 45 000 - 55 000 (244) und entspricht damit wohl eher einem Serum-F. VII. Autoprothrombin I, dessen Aktivität der des Faktors VII entspricht, hat ein Molekulargewicht von 35 000 (117).

Die Konzentration des bovinen Faktors beträgt 0,13 - 0,15mg/l Plasma (136, 149); RADCLIFFE und NEMERSON (233) fanden mit 1mg/l einen sehr viel höheren Wert. Die Faktor VII-Konzentration im menschlichen Plasma liegt unter 1mg/l (153).

Der isoelektrische Punkt des humanen Faktors VII liegt bei pH 4,5 (153). Boviner Faktor VII besteht aus einer Peptidkette (233, 234) mit einem Kohlehydrat-Anteil von 13% (149). Wird das Protein bei der Darstellung nicht durch

Benzamidin vor Proteolyse geschützt, erhält man zwei Peptidketten, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden (136, 233). Durch Einwirkung von Thrombin oder Faktor X_a entsteht ebenfalls ein zweikettiger Faktor VII, der eine wesentlich höhere Aktivität zeigt.

Das aktive Zentrum des Moleküls liegt am Carboxyl-Ende (233), die aminoterminale Region ist wahrscheinlich für die Kalzium-Bindung zuständig (149).

Faktor X

Das Molekulargewicht von bovinem Faktor X beträgt - gemessen mit der Ultrazentrifuge - 55 000 bis 59 000 (20, 71, 78, 81, 83, 131, 132). Die Ergebnisse mit der Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese sind ähnlich: 48 000 - 56 000 (20, 232). Ein MG 37 772 wurde von TISHKOFF und Mitarb. (277) in Gegenwart von Mercaptoäthanol gefunden; das scheint aber wohl eher nur das MG für die schwere Kette des Moleküls zu sein. Der aktivierte bovine Faktor X (F. X_a) hat ein MG von 48 000 (232). Die Konzentration des Faktors im bovinen Plasma ist 0,3 - 0,7mg/100ml (254, 78).

Für humanen Faktor X wurde mit SDS-Gelelektrophorese ein MG von 75 000 gefunden (151); mit Gelfiltration ein Wert von 72 000 (107). Humaner Faktor X_a hat ein MG von 24 000 (107).

Boviner Faktor X und Faktor X_a bestehen aus zwei Peptidketten, einer leichten Kette, die die aminoterminale Region des Moleküls enthält, und einer schweren mit dem Carboxyl-Ende (20, 131, 254); die Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden (232). MATTOCK und ESNOUF (187) konnten jedoch einen Faktor X isolieren, der aus einer einzigen Peptidkette besteht und vermuteten daher, daß nativer Faktor X - ähnlich wie Faktor VII - erst durch die Spaltung einer Peptidbindung bei der Isolierungsprozedur zweikettig wird.

Die leichte Kette des Faktor X enthält die Kalzium-Bindungsstellen und ist damit vermutlich für die Bindung der Phospholipidmizellen zuständig (66, 97).

Humaner Faktor X enthält mindestens drei Kalzium-Bindungsstellen (151).

Das aktive Zentrum des Moleküls sitzt auf der schweren Kette (79, 164, 278, 279); der gesamte Kohlehydrat-Anteil des Moleküls (10%) ist ebenfalls an die schwere Kette gebunden (78, 82). Bei der Aktivierung des Faktors X werden zwei Peptide vom Amino- und Carboxyl-Ende der schweren Ketten abgespalten; da sie den gesamten KH-Anteil enthalten, ist der bovine Faktor X_a frei von Kohle-

hydraten (77, 79, 82, 83, 135, 137, 232, 278).

Im Gegensatz dazu enthält der menschliche Faktor X_a noch 14% Kohlehydrate (87, 107).

Bei der Darstellung von bovinem Faktor X konnten JACKSON und HANAHAN (132) sowie FUJIKAWA und Mitarb. (81) zwei verschiedene Spezies des Faktors von einer DEAE-Sephadex-Säule eluieren: Faktor X_1 und Faktor X_2. Die beiden unterscheiden sich nicht in der Primärstruktur und im immunologischen Verhalten (71, 78, 132); bis auf eine beim Faktor X_1 fehlende Neuraminsäure (131) ist auch der KH-Gehalt beider Faktoren gleich. Die biologische Aktivität des Faktor X_2 scheint aber geringer zu sein: Faktor X_1 wird 70 mal schneller durch Faktor IX_a aktiviert als Faktor X_2 (81) und zeigt auch eine zweifach höhere Gerinnungsaktivität (71).

3.1.1.2 Gemeinsame Eigenschaften

Aus den dargelegten Befunden geht hervor, daß die Vitamin K-abhängigen Faktoren II, VII, X (s.S. 23) einen ähnlichen Aufbau ihrer Moleküle haben, der im übrigen auch für den vierten Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktor, den Faktor IX, zutrifft: Die aminoterminale Region bindet Kalziumionen, das aktive Zentrum liegt in der carboxyterminalen Region. Darüberhinaus zeigen sie eine gewisse immunologische Kreuzreaktivität (76), die allerdings von SEEGERS und Mitarb. (253) nicht bestätigt werden konnte. Dies liegt möglicherweise an dem unterschiedlichen Reinheitsgrad der zur Antikörperstimulation verwendeten reindargestellten Faktoren. Die Faktoren II, VII, IX, X sowie das ebenfalls Vitamin K-abhängige Protein C, dessen Rolle im Ablauf der Gerinnungsreaktion zwar noch nicht eindeutig geklärt ist, das aber offensichtlich nach seiner Aktivierung durch Thrombin als Protease wirken und dabei einen gerinnungshemmenden Einfluß entwickeln kann (148), zeigen auch eine Übereinstimmung der Primärstruktur in vielen Abschnitten ihrer Moleküle; man nimmt deshalb an, daß sie sich im Laufe der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül entwickelt haben (33, 65, 66, 76, 149). Da die bovinen Faktoren VII, IX, X ein geringeres Molekulargewicht haben als bovines Prothrombin, muß im Laufe der Evolution eine Addition oder Deletion bei dem vermuteten Vorläufer stattgefunden haben (66).

Diese Annahme wird unterstützt durch die Ergebnisse einer Untersuchung von

HEWETT-EMMETT und Mitarb. (125). Sie fanden in der Primärstruktur der Intermediate 3 und 4 des bovinen Prothrombins Bereiche mit sich wiederholender Aminosäuren-Sequenz und führten dies auf eine partielle Genverdoppelung zurück, die vor ca. 300 Mio. Jahren stattgefunden haben muß.

Damit ist die Verwandtschaft dieser Gerinnungsfaktoren aber nicht erschöpft. Es wurden auch Ähnlichkeiten der Primärstruktur der Faktoren II, IX, X und der des Trypsins, Chymotrypsins, des Plasmins und der Elastase gefunden (65, 278, 279).

Die phylogenetische Verwandtschaft erklärt auch die Ähnlichkeit vieler physikochemischer Eigenschaften der Faktoren II, VII, IX, X: Durch Adsorption und Elution an schwer lösliche Verbindungen, isoelektrische Fällung und Fällung mit Ammoniumsulfat (4, 251) konnten die Faktoren bisher nur selten und unvollständig getrennt werden (4, 70). Die Trennung des Prothrombins von den anderen Faktoren durch Chromatographie an Bariumsulfat gelang nur mit einer speziellen Bariumsulfatpräperation (Merck, fein gepulvert, 22). Die Adsorption an schwer lösliche Verbindungen ist häufig mit einer teilweisen Denaturierung der Proteine verbunden: SWART und Mitarb. (274) konnten bei der Elution der humanen Faktoren II bis X von $Al(OH)_3$ eine umso geringere Rückgewinnung der Aktivität beobachten, je länger die Faktoren adsorbiert waren und je höher die Temperatur war.

Bei der Adsorption an Bariumsalze spielen einmal unspezifische Adsorptionskräfte nach Art der van der Waal'schen Dispersionskräfte eine Rolle (22). Zum anderen scheinen aber auch die Kalzium-bindenden Regionen (mit ihren elektrostatischen Bindungseigenschaften) für die Adsorption an $BaSO_4$ mitverantwortlich zu sein. Das geht aus den Beobachtungen von PRYDZ (226) hervor, der mit zweiwertigen Ionen (Ca^{++}, Sr^{++}) eine Adsorption des Faktors VII an $BaSO_4$ verhindern konnte, und aus der Tatsache, daß die PIVKA's nicht oder schlechter an $BaSO_4$ adsorbiert werden (s.S.28). Auch in ihren sonstigen elektrostatischen Bindungseigenschaften unterscheiden sich die Faktoren nur gering. So konnte VOSS (287) die humanen Faktoren II bis X durch Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose nicht voneinander trennen, obwohl sich dieses Verfahren gut zur Trennung von Proteinen eignet. Eine Trennung der Faktoren war nur möglich, wenn die Gerinnung bereits abgelaufen war; die damit verbundene Änderung der Molekülstrukturen bedingt auch eine Veränderung der elektrostatischen Eigenschaften, u.a. einen Anstieg des isoelektrischen Punktes des Faktors VII von 4,5 auf 5,3 - 5,6 (106, 153).

Andrerseits enthalten Prothrombin-Komplexpräparate, die zur Substitutionstherapie verwandt werden, weniger Faktor VII als Faktor X und II, wenn sie durch Chromatographie an DEAE-Ionenaustauschern hergestellt wurden (36, 53, 126, 293). CASILLAS und Mitarb. (36), HEMKER und Mitarb. (123) sowie LECHNER und DEUTSCH (161) erhielten durch Chromatographie an DEAE-Cellulose Konzentrate der Faktoren II und X, die nahezu frei von Faktor VII waren.

Wegen der engen physikochemischen Verwandtschaft lassen sich die Faktoren des Prothrombin-Komplexes nur durch eine Kombination mehrerer Trennverfahren, die u.a. mehrmalige Ionenaustauscherchromatographie, Disk-Gelelektrophorese und Gelfiltration einschließt, voneinander trennen. Dementsprechend arbeitsaufwendig und komplex sind diese Verfahren.

Die Stabilität der Faktoren ist offensichtlich vom umgebenden Milieu abhängig: Während die Faktoren im Plasma oder Serum lange Zeit stabil sind (17, 31, 150), neigen die gereinigten Faktoren zur Aggregation (71, 78, 135, 157, 228). Beim Faktor VII ist dies mit einem Aktivitätsverlust verbunden; er kann verhindert werden, wenn Serumalbumin oder Glycerin zu dem gereinigten Faktor gegeben wird (153, 225, 233).

3.1.2 Physiologie der Faktoren II, VII, X

Die Gerinnungsfaktoren II, VII, X werden von den Leberparenchymzellen synthetisiert. Das geht aus Untersuchungen mit fluoreszierenden Antikörpern, mit Leberzellkulturen und Perfusionen isolierter tierischer Lebern hervor (14, 21, 58, 210, 230, 239, 271). Tierexperimente (Leberexstirpation und Perfusion isolierter Organe), zeigen, daß auch in anderen Organen, wie Milz und Niere, eine Synthese dieser Faktoren möglich ist (58, 144). Die extrahepatische Synthese spielt jedoch zumindest beim Menschen keine Rolle, wie die klinische Beobachtung von Patienten mit einem plötzlichen Ausfall der Leberfunktion und mit Zirrhose beweisen (73, 111, 159, 236).

Zur Synthese von funktionsfähigen Molekülen der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X wird das Vitamin K benötigt. Besteht ein Vitamin K-Mangel in der Leber oder wird sein Einfluß durch Antagonisten (Coumarin-, Indandionderivate) aufgehoben, so nimmt die Aktivität der Faktoren II, VII, IX und X entsprechend ihrer Halbwertszeit mehr oder weniger schnell ab (120, 150, 170, 208, 211).

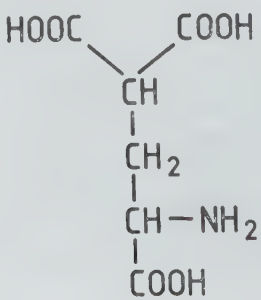
Daneben scheint das Vitamin K auch noch einen Einfluß auf die Synthese ande-

rer Gerinnungsfaktoren zu haben: NOWICKI und Mitarb. (208) stellten bei Patienten unter Dicumaroltherapie zusätzlich eine geringe Aktivitätsminderung der Faktoren V und VIII fest. OWEN jr. und BOWIE (215) fanden an Ratten bei Gabe von Vitamin K-Antagonisten bzw. Vitamin K-Mangel neben einer starken Aktivitätsminderung der Faktoren II, VII, IX und X auch eine mäßige Aktivitätsminderung der Faktoren V, VIII, XI und XII, die nach Vitamin K-Gabe wieder zurückging. Trotzdem werden als Vitamin-K-abhängige Faktoren gewöhnlich nur die Faktoren II, VII, IX und X bezeichnet.

Vitamin K greift nicht in die Eiweißsynthese der Vitamin K-abhängigen Faktoren ein (211); die Wirkung setzt vielmehr an einem postribosomalen Syntheseschritt an (14, 210, 211, 230, 239, 271). PRYDZ und GAUDERNACK (230) zeigten, daß Vorstufen des Faktors VII im Golgi-Apparat von Rattenleberzellen angesammelt werden; wegen des ähnlichen Molekülaufbaus (s.S. 21) ist dies wohl auch für die anderen drei Faktoren anzunehmen. Unter Vitamin K-Einwirkung werden sie in die vollständigen Gerinnungsfaktoren umgewandelt und ins Plasma ausgeschüttet (14, 211, 230, 239).

Das Vitamin K wirkt bei dieser Umwandlung offensichtlich nicht direkt auf das Vorläufermolekül ein, sondern steuert die Aktivität eines Enzyms: CHUNG und Mitarb. (39) fanden im Überstand einer Mikrosomenfraktion aus Rattenleberzellen ein Vitamin K-abhängiges Enzym, das die in den Mikrosomen gebildete Vorstufe des Faktors VII in den vollständigen Faktor VII umwandeln konnte.

Über die Art der Veränderung am Vorläufermolekül durch Vitamin K bestand lange Zeit Unklarheit. Es wurde vermutet, daß Vitamin K mit der Ankupplung von Kohlehydrat-Ketten an das Proteingerüst zu tun habe (228, 230). Nachdem sich aber gezeigt hatte, daß die Moleküle der Faktoren II, VII, IX, X, die bei Vitamin K-Mangel produziert werden, keine Unterschiede im KH-Gehalt zu den normalen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X zeigen (s.S. 28), war diese Vermutung widerlegt.



NELSESTUEN und Mitarb. (201) und STENFLO und Mitarb. (266) gelang es schließlich, aus Peptiden vom Aminoende des Prothrombinmoleküls eine bisher unbekannte Aminosäure zu isolieren, die γ-Carboxylglutaminsäure (s. nebenstehende Abb.). Bei Vitamin K-Mangel fand sich an diesen Stellen Glutaminsäure (266). Die γ-Carboxylglutamin-

säuren vermitteln die Bindung der Kalziumionen (201, 265, 266), die für die normale Aktivierung des Prothrombins erforderlich ist (s.S. 37). Bei den Faktoren IX und X wurde die γ-Carboxylglutaminsäure ebenfalls nachgewiesen (33, 75). Da auch Faktor VII Kalziumionen bindet (s.S. 20), dazu noch eine homologe Aminosäuresequenz hat, die bei Vitamin K-Mangel produzierten Moleküle sich ganz ähnlich verhalten (s.S. 28), ist anzunehmen, daß auch beim Faktor VII unter Vitamin K-Einfluß die γ-Carboxylglutaminsäuren gebildet werden.

Trotz der engen Verwandtschaft der vier Gerinnungsfaktoren sind ihre Halbwertszeiten im Plasma recht unterschiedlich: Prothrombin 48 - 120h, Faktor X 48h, Faktor IX 18 - 30h und Faktor VII nur 4 - 6h (27, 30, 169, 171, 185, 257). Die Aktivität der Faktoren bleibt im Laufe des Lebens nicht konstant. In den ersten Lebenstagen zeigen die Neugeborenen eine verminderte Aktivität vieler Gerinnungsfaktoren, darunter auch die der Vitamin K-abhängigen Faktoren (1, 2, 47, 152, 172). Als Ursache wird ein Vitamin K-Mangel (60) oder eine verminderte Vitamin K-Wirkung - besonders bei Frühgeborenen wegen der Unreife der Leber (1, 2) - angenommen. Die Aktivität der Faktoren nimmt noch in der Neugeborenenzeit rasch zu, nähert sich aber erst im Laufe des ersten Lebensjahres den Durchschnittswerten der Erwachsenen (1, 2, 152).

Verschiedene Untersucher konnten bei der Einnahme von oestrogenhaltigen Kontrazeptiva und gegen Ende der Schwangerschaft eine erhöhte Aktivität der Vitamin K-abhängigen Faktoren feststellen, wobei Prothrombin und Faktor VII die stärksten Schwankungen während des Zyklus bei der Verwendung von Kontrazeptiva zeigten. Die Häufigkeit der kälteinduzierten Aktivierung des Faktors VII (s.S. 34) war dabei ebenfalls erhöht. Post partum und nach Absetzen der Kontrazeptiva gehen diese Veränderungen wieder zurück (32, 98, 104, 105, 172, 177, 178, 249). Dagegen konnten LECHNER und Mitarb. (162) bei der Verabreichung von Neogynon sowie der beiden darin enthaltenen Komponenten Äthinylöstradiol und D-Norgestrel außer einem Anstieg der Plasminogenkonzentration keine statistisch signifikante Veränderung eines Gerinnungsparameters, darunter auch der Faktor X- und Faktor IX-Aktivität, im Verlauf eines Zyklus beobachten. Nach Meinung der Autoren beruht dieser Unterschied auf der Art ihres Versuchsansatzes und der statistischen Berechnung. Es ist aber auch denkbar, daß die Vielzahl der angewandten Kontrazeptiva für diese Unterschiede verantwortlich ist.

Im Jugendalter ist die Aktivität des Faktors VII von Knaben gegenüber der von gleichaltrigen Mädchen und Erwachsenen erniedrigt (59). Unabhängig von Ge-

schlecht oder Einnahme östrogenhaltiger Präparate nimmt die Aktivität der Faktoren VII und IX mit steigendem Alter zu.

3.1.3 Pathophysiologie

Bereits im vorigen Abschnitt wurden die Aktivitätsänderungen geschildert, die physiologischerweise im Laufe des Lebens auftreten. Nun sollen einige Änderungen beschrieben werden, die bei pathologischen Zuständen vorkommen. Dazu gehören einmal Synthesestörungen, deren Ursache ein kongenitaler Defekt, ein Vitamin K-Mangel oder eine Lebererkrankung sein kann. Zum anderen gehören dazu Umsatzstörungen, wie sie z.B. im Verlauf einer disseminierten intravaskulären Gerinnung auftreten. Auf sie soll hier nicht eingegangen werden.

Kongenitale Defekte

"Inborn errors of metabolism" kommen in allen Bereichen des Stoffwechsels vor; deshalb ist es nicht verwunderlich, daß auch bei allen Gerinnungsfaktoren angeborene Defekte beschrieben sind. Meist führte ja erst die Untersuchung eines Patienten mit einem kongenitalen Defekt zur Entdeckung des betreffenden Gerinnungsfaktors.

Die Vererbung von Defekten der Vitamin K-abhängigen Faktoren erfolgt - mit Ausnahme der Hämophilie B - autosomal rezessiv oder intermediär (17, 42, 54, 190, 255, 288), wobei die Unterscheidung rezessiv oder intermediär im wesentlichen von der Empfindlichkeit der Untersuchungsmethoden abhängt. Beim Faktor VII-Defekt sind Kombinationen mit Defekten des Faktors VIII und IX beschrieben worden. Bei einer zufälligen Kombination eines Faktor VII-Defektes mit einer Hämophilie A oder B wurde die Hämophilie X-chromosomal rezessiv weitergegeben (116, 295), während der Faktor VII-Defekt autosomal rezessiv vererbt wurde. Andrerseits kann ein kombinierter Faktor VIII-Defekt offensichtlich auch gekoppelt weitergegeben werden; die Vererbung dieses gekoppelten Gerinnungsdefekts ist autosomal dominant (93). Bei isolierten Defekten besteht eine Blutungsneigung nur bei den Patienten, die an einem homozygoten II-, VII-, X-Defekt leiden (30, 42, 54, 281).

Faktor VII- und Faktor IX-Defekte sind auch bei Beagle-Hunden und Terriern beschrieben worden (109, 198, 199, 262).

Meistens bewirken die Veränderungen im genetischen Code, die die Ursachen für die Defekte der Prothrombin-Komplexfaktoren sind, daß der betreffende Gerinnungsfaktor entweder gar nicht gebildet wird oder doch so verändert gebildet wird, daß er immunologisch nicht mehr erkannt werden kann. Es gibt aber auch Defekte der Faktoren II, VII, IX und X, bei denen die Gerinnungsaktivität fehlt, die jeweiligen Faktoren mit immunologischen Methoden aber nachgewiesen werden können (93, 94, 95, 96, 111, 142, 145, 147, 258). Bei einigen dieser "abnormalen" Gerinnungsfaktoren sind noch Teilfunktionen der normalen Gerinnungsaktivität erhalten: Dies ist der Fall bei einigen Dysprothrombinämien (94, 142, 145) sowie bei einigen Defekten der anderen Vitamin K-abhängigen Faktoren:
So zeigt Proconvertin "Padua" eine Aktivität von 9%, wenn zu seiner Aktivierung ein Thromboplastinpräparat aus Kaninchenlunge oder -hirn verwendet wird. Bei der Verwendung von Rinderhirnthromboplastin zeigt es normale Werte (95). Faktor X "Friuli" kann nur durch Stypven aktiviert werden; die physiologische Aktivierung über das Extrinsic oder Intrinsic System gelingt nur unvollständig (96).

Das defekte Molekül kann sogar neue Eigenschaften entwickeln:
Es gibt Varianten der Hämophilie B, bei denen das defekte Molekül zwar keine Faktor IX-Aktivität mehr hat, dafür aber im Extrinsic System als Inhibitor auftritt. Dieser Inhibitor-Effekt ist jedoch nur mit Rinderhirnthromboplastin zu erkennen (147).

Vitamin K-Mangel

Besteht in der Leber ein Vitamin K-Mangel oder wird es bei ausreichendem Angebot durch kompetitive Inhibitoren (Vitamin K Antagonisten: 4-Hydroxicumarin- und Indandion-Derivate) von seinem Wirkort verdrängt, wird die Synthese der Faktoren II, VII, IX und X gehemmt (s.S. 23). Die dadurch bedingte Hypokoagulabilität wird zur Thromboseprophylaxe eingesetzt. HEMKER und Mitarb. (124) stellten 1963 bei kinetischen Untersuchungen im Plasma von Patienten, die auf diese Weise behandelt wurden, einen kompetitiven Inhibitor fest. Sie nannten ihn PIVKA (Protein Induced by Vitamin K Absence). Nach den Untersuchungen von GIROLAMI und Mitarb. (91, 92) ist die Hemmwirkung jedoch stark von der Art des verwendeten Thromboplastins abhängig.

Weitere Untersuchungen zeigten, daß bei Vitamin K-Mangel beim Mensch oder Rind gerinnungsinaktive Proteine im Plasma auftraten, die sich immunologisch nicht oder fast nicht von den normalen Faktoren II, VII, IX, X unterscheiden (49, 85, 87, 111, 122, 159, 167, 182, 237). Daher wurden sie als PIVKA-II, PIVKA-VII, PIVKA-IX und PIVKA-X bezeichnet. In dem Maße, wie die normalen Faktoren bei Vitamin K-Mangel abnehmen, nimmt die Konzentration der PIVKA's zu, sodaß die Summe der immunologisch als Faktor II, Faktor IX, Faktor X reagierenden Moleküle immer gleich zu bleiben scheint (167). Ob die ebenfalls immunologisch nachweisbaren intrazellulären Faktor VII-Vorläufer (230, s.S. 24) mit dem PIVKA-VII identisch sind, ist bisher noch nicht untersucht worden. Am genauesten wurde PIVKA-II untersucht. Neben der schon erwähnten immunologischen Identität zeigt PIVKA-II auch im elektrophoretischen Verhalten eine weitgehende Übereinstimmung mit dem Prothrombin. Auch in der Aminosäure- und Kohlehydratzusammensetzung finden sich keine Unterschiede (88, 167, 182, 200, 264, 267). In Gegenwart von Kalziumionen wandern die PIVKA's allerdings schneller (237) als die jeweiligen normalen Gerinnungsfaktoren des Prothrombin-Komplexes. PIVKA-II wird im Gegensatz zu Prothrombin nicht an Bariumsalze adsorbiert (267) und kann keine Kalziumionen binden; auch das Intermediate 3 des PIVKA-II, also die Region des Moleküls, die beim normalen Prothrombin für die Kalziumbindung des Prothrombins verantwortlich ist (s.S. 18), bindet keine Kalziumionen (19, 85, 182, 200, 265). Der wichtigste Unterschied zwischen Prothrombin und PIVKA-II besteht jedoch in der biologischen Aktivität der beiden Moleküle: PIVKA-II kann durch den physiologischen Prothrombinaktivator (Faktor X_a zusammen mit Kalziumionen, Faktor V und Phospholipiden) nicht oder nur sehr langsam aktiviert werden, während sich bei der Aktivierung durch einen unphysiologischen Aktivator (z.B. Trypsin) rasch Thrombinaktivtät entwickelt (167, 182, 200, 267). Diese unterschiedliche Aktivierbarkeit hängt mit der Kalzium-Bindungsfähigkeit zusammen; Kalziumionen vermitteln die Bindung des Prothrombins an die Phospholipidmizellen und beschleunigen so die Aktivierung des Prothrombins um das 40-fache (19, 97).

Das Prothrombin enthält in seinen kalziumbindenden Regionen die γ-Carboxylglutaminsäure, die die Kalziumbindung vermittelt (s.S. 24); PIVKA-II enthält an diesen Stellen nur Glutaminsäure. PIVKA-IX und -X werden ebenfalls weniger leicht an Bariumsalze und andere schwerlösliche Verbindungen adsorbiert (85, 87, 122, 167). Ihre elektrophoretische Beweglichkeit bleibt wie die von PIVKA-II in Gegenwart von Kalziumionen konstant, während die Beweglichkeit der

intakten Faktoren II, IX, X unter diesen Bedingungen geringer ist (167, 237). Deshalb muß man auch bei PIVKA-IX und -X eine fehlende Kalziumbindungsfähigkeit als Ursache ihrer biologischen Inaktivität annehmen. PIVKA-VII wurde bisher noch nicht so genau wie die anderen PIVKA's untersucht, vermutlich, weil seine Plasmakonzentration so gering ist. Wegen der engen Verwandtschaft zu den anderen drei Vitamin K-abhängigen Faktoren ist aber auch hier mit größter Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß der Unterschied zwischen Faktor VII und PIVKA-VII durch die Glutaminsäuren oder γ-Carboxylglutaminsäuren bedingt ist.

Die Umwandlung der Glutaminsäuren in die γ-Carboxylglutaminsäuren in den aminoterminalen Regionen der Moleküle ist vielleicht nicht der einzige Effekt des Vitamin K. MORRISON und ESNOUF (193) fanden mehrere Spezies von PIVKA-II im Plasma von Patienten, die mit Dicumarol behandelt wurden.

LOEW und VINAZZER (173) beschrieben bei der hochdosierten Gabe von Acetylsalicyl-Säure Veränderungen im Plasma, die sich mit dem Auftreten von PIVKA's erklären lassen.

Lebererkrankungen

Da fast alle Gerinnungsfaktoren hauptsächlich in der Leber gebildet werden, sind die Aktivitätsminderungen der Vitamin K-abhängigen Faktoren bei Lebererkrankungen verständlich (73, 208). Bei der Zirrhose oder der "akuten gelben Leberatrophie" ist die gesamte Syntheseleistung der Leber vermindert oder sogar aufgehoben; dementsprechend ist auch die Aktivität der Faktoren II, VII, IX, X vermindert. Die immunologisch nachweisbare Menge der Faktoren nimmt ebenfalls ab (111, 159, 209), ein Zeichen dafür, daß nicht nur wie beim Vitamin K-Mangel gerinnungsinaktive Proteine gebildet werden, sondern daß die Proteinsynthese selbst vermindert ist. Es ist jedoch zu beachten, daß bei derartigen Lebererkrankungen nicht nur die Syntheseleistungsstörung als Ursache der Aktivitätsminderung anzusehen ist, sondern auch eine Umsatzsteigerung im Sinne eines Verbrauchs (Übersicht bei RATNOFF, 236). Beim Obstruktionsikterus findet man die immunologisch feststellbare Konzentration weniger stark vermindert als die Gerinnungsaktivität (159); daraus läßt sich ableiten, daß der Vitamin K-Mangel im Vordergrund steht und nicht der Synthesedefekt.

3.2 Eigenschaften des Gewebsfaktors

Bei der Verletzung von Geweben kommt das Blut mit dem Gewebsfaktor in Berührung. Er ist in fast allen Geweben zu finden (108, 296), bildet mit dem Gerinnungsfaktor VII einen Komplex und setzt so das Extrinsic System des plasmatischen Gerinnungssystems in Gang (s.S. 14). Der Gewebsfaktor (GF) kann auch von Fibroblasten, Endothelzellen (188) und Leukozyten gebildet werden. Die Bildung des GF in Leukozyten wird unter dem Einfluß homologer Leukozyten, des Endotoxins und des Komplementfaktors 3b in vitro stark vermehrt (197, 229, 241). Die Stimulierung der GF-Synthese in den Granulozyten ist vermutlich für die Endotoxin-induzierte disseminierte intravaskuläre Gerinnung verantwortlich (163). Der GF besteht aus einem Protein- und einem Lipidanteil; der Proteinanteil ist nur in der Kombination mit dem Lipidanteil gerinnungsaktiv (52, 130, 203, 207, 223), während der Lipidanteil für sich alleine auch die Phospholipide ersetzen kann (52), die bei der Aktivierung anderer Gerinnungsfaktoren als Faktor VII sowie der Faktoren des Intrinsic Systems benötigt werden. NEMERSON (203) isolierte den Proteinanteil des bovinen Lungen- und Hirn-GF. Er erhielt Proteine mit einem MG von 420 000, die nur geringfügige physikochemische Unterschiede aufwiesen. Er war nicht in der Lage, diese physikochemischen Unterschiede mit dem unterschiedlichen biochemischen Reaktionsverhalten (s.S. 31) in Verbindung zu bringen. Später fanden NEMERSON und PITLICK (206, 223) bei der Isolierung des Proteins aus bovinem Lungen-GF zwei Proteine mit einem MG von 330 000 und 220 000, wobei das kleinere Protein eine höhere Aktivität zeigte. Bei der Rekombination der Apoproteine zu komplettem GF wurde mit Phosphatidyläthanolamin und -cholin die höchste Aktivität erreicht.

Präparate des Gewebsfaktors werden aus verschiedenen Organen hergestellt; sie werden als Gewebsthromboplastine bezeichnet. Sie dienen bei der Durchführung von Gerinnungstests zur Aktivierung des Extrinsic Systems. Von diesen Tests ist die Prothrombinbestimmung nach QUICK am weitesten verbreitet, die von ihrem Autor ursprünglich als spezifische Faktor II-Bestimmung eingeführt wurde. Nach der Entdeckung der anderen Faktoren des Extrinsic Systems wird diese Methode heute als Globaltest zur Überp. ung des Extrinsic Systems eingesetzt. Dabei zeigen die Gewebsthromboplastine verschiedener Spezies und verschiedener Organe ein unterschiedliches Verhalten in ihren Reaktionen. Schon frühzeitig war bei der Therapie-Kontrolle von Patienten, die aufgrund einer

Behandlung mit indirekten Antikoagulantien (Vitamin K Antagonisten) im Extrinsic System einen Defekt der Faktoren II, VII und X aufwiesen, festgestellt worden, daß sich die "Quick-Werte" nicht miteinander vergleichen ließen, wenn verschiedene Thromboplastinpräparate benutzt worden waren (114, 191, 284, 285). Obwohl der "Quick-Test" als Global-Test die Aktivitätsänderungen der drei Vitamin K-abhängigen Faktoren des Extrinsic Systems erfaßt, reagieren die verschiedenen Gewebsthromboplastine mit unterschiedlicher Empfindlichkeit auf Aktivitätsänderungen der Faktoren II, VII, X, die aufgrund ihrer verschiedenen Halbwertszeiten (s.S. 25) insbesondere bei Therapiebeginn nicht gleichmäßig vermindert sind.

Im allgemeinen scheinen Präparationen aus Lungengewebe besonders empfindlich auf Veränderungen der Faktor X-Aktivität zu reagieren, während Hirnthromboplastine mehr auf Veränderungen in der Aktivität des Prothrombins und des Faktors VII reagieren (13, 48, 114, 191, 224). Die geringere Empfindlichkeit der Lungenthromboplastine auf Unterschiede im Faktor VII-Gehalt des Plasmas erklärt DENSON (48) mit einer Kontamination mit Faktor VII, die er in Lungenthromboplastinpräparaten nachweisen konnte. Hirnthromboplastine wiesen diese Verunreinigung nicht auf. SPURLING und SAVORY (263) stellten Thromboplastinpräparate aus dem Gehirn von normalen Beagle-Hunden und solchen mit einem Faktor VII-Defekt her. Sie bemerkten, daß die Präparate von den Hunden mit einem Faktor VII-Defekt eine höhere Empfindlichkeit auf Veränderungen im Faktor VII-Gehalt eines Plasmas zeigten als die Präparate von normalen Hunden. Daraus schlossen sie, daß auch Hirnthromboplastinpräparate mit Faktor VII kontaminiert sein können.

Die geringe Empfindlichkeit der Lungenthromboplastine gegenüber dem Faktor VII läßt sich mit der größeren Faktor VII-Kontamination erklären; nicht damit erklären läßt sich jedoch die größere Empfindlichkeit der Lungenthromboplastine für den Faktor X.

Unter den Hirnthromboplastinen bestehen speziesabhängige Unterschiede. Nach SCHRÖER (248: S. 319) haben Thromboplastinpräparate aus homologem Hirn die größte Gerinnungswirksamkeit. LAAKE und Mitarb. (153) konnten zeigen, daß nur mit Thromboplastin aus Rinderhirn, nicht dagegen aus Kaninchen- oder menschlichem Hirn, die verschiedenen aktivierten Formen des humanen Faktors VII (s.S. 35) nachgewiesen werden können. Rinderhirnthromboplastin scheint darüber hinaus noch eine weitere spezielle Empfindlichkeit gegenüber dem Faktor VII zu besitzen: Das abnorme Prokonvertin "Padua" zeigt mit diesen Präparaten eine

höhere Aktivität, auch die Hemmwirkung der abnormen Faktor IX-Moleküle ist nur mit Rinderhirnthromboplastin zu erkennen (s.S. 27).

3.3 Die Aktivierung der Faktoren VII, X, II während des Gerinnungsablaufs

Aktivierung des Faktors VII

Der Gewebsfaktor bildet mit Faktor VII in Gegenwart von Kalziumionen schnell einen Komplex (106, 136, 202, 205, 233, 294). Die Komplexbildung führt zu einer Aktivierung des Faktors VII (212); der Gewebsfaktor-Faktor VII_a-Komplex bzw. der Phospholipoproteid-Faktor VII_a-Komplex (212) entwickelt eine enzymatische Aktivität gegenüber dem Faktor X, der dadurch seinerseits aktiviert wird (106, 153, 202, 294).

Lange Zeit war nicht klar ob die enzymatische Aktivität des Gewebsfaktors in der Lage ist, den Faktor X zu aktivieren, oder ob dies allein auf die Aktivität des Faktors VII zurückzuführen ist. NEMERSON und SPAET (207) fanden bei ihren Untersuchungen eine direkte Aktivierung des Faktors X durch Gewebsfaktor; sie hatten dabei die Plasmen von Patienten mit angeborenen Faktor VII- und Faktor X-Defekten verwendet. Auch FUJIKAWA und Mitarb. (77) bemerkten bei ihren Untersuchungen mit rein dargestellten Faktoren eine sehr langsame Aktivierung des Faktors X durch Gewebsfaktor; dagegen konnte Faktor VII den Faktor X ohne Gewebsfaktor nicht aktivieren. In späteren Versuchen führte NEMERSON (202) die Aktivierung des Faktors X auf die Kontamination seiner Faktor X-Präparate mit Faktor VII zurück.

Die Resultate von NEMERSON (207) und FUJIKAWA (77) können auch durch eine Kontamination der Thromboplastinpräparate mit Faktor VII (s.S. 31) verursacht worden sein.

Somit scheint klar zu sein, daß Faktor X nicht allein durch Gewebsfaktor aktiviert werden kann.

Hinweise dafür, daß Faktor VII das aktive Enzym ist, geben die Versuche von WILLIAMS und NORRIS (294) sowie von ØSTERUD und Mitarb. (212). WILLIAMS und NORRIS hatten ein Faktor VII-Präparat hergestellt und fanden, daß der Faktor VII in einer Charge dieses Präparates bei der Lagerung so aktiviert

worden war, daß er ohne Gewebsfaktor in Gegenwart von Kalziumionen den Faktor X aktivieren konnte. ØSTERUD und Mitarb. inkubierten gereinigten Faktor VII mit Gewebsfaktor und entfernten dann den Proteinanteil des Gewebsfaktors mit Hilfe von Phospholipase. Damit hatte der Gewebsfaktor seine "Gewebsfaktor-spezifische" Aktivität verloren; der immer noch an den Phospholipidanteil gebundene aktivierte Faktor VII war aber weiterhin gerinnungsaktiv.

NEMERSON und ESNOUF (205) bemerkten eine Reduktion des Molekulargewichtes des bovinen Faktors VII nach der Reaktion mit Gewebsfaktor; JESTY und NEMERSON (136) konnten ein Jahr später zeigen, daß die Proteolyse nur in einem Protein auftrat, das als Verunreinigung in dem Faktor VII-Präparat vorhanden war. Das Molekulargewicht von Faktor VII änderte sich nicht. Die enzymatische Aktivität des humanen Faktors VII_a bleibt erhalten, wenn der Faktor VII_a an den Phospholipidteil des Gewebsfaktors gebunden bleibt; sie geht verloren, wenn der Phospholipidteil ebenfalls vom Faktor VII-Molekül abgetrennt wird (212). Durch Zugabe eines neuen Gewebsfaktors kann sie wieder erhalten werden. Damit stellt sich die Aktivierung des Faktors VII durch Gewebsfaktor als reversibler Vorgang dar (106).

Faktor VII, der aus Serum isoliert wird, hat ein niedrigeres Molekulargewicht als der, der aus Plasma isoliert wird (s.S. 19). Außerdem zeigt er eine höhere Aktivität als der Plasma-Faktor VII; diese Eigenschaft war von ALEXANDER und Mitarb. als SPCA-Aktivität (Serum Prothrombin Conversion Accelerator) beschrieben worden (7, 8, 18, 72, 140, 141, 150, 256, 261, 289). Diese Befunde lassen auf eine Aktivierung des Faktors VII durch das Intrinsic System schließen, da sich die erhöhte Aktivität des Faktors VII im Serum auch ohne Zugabe von Gewebsthromboplastin entwickelte. Um die Frage zu klären, welche Faktoren des Intrinsic Systems an der Aktivierung des Faktors VII beteiligt sind, bestimmten JOHNSTON und HJORT (140) sowie JOSSO und BEGUIN (141) die Aktivität des Faktors VII im Plasma und im Serum von Patienten mit kongenitalen Gerinnungsfaktor-Mängeln. Ließ sich in einem dieser Mangelplasmen der übliche Anstieg der Faktor VII-Aktivität nach dem Ablauf der Gerinnung im Serum nicht nachweisen, wurde auf eine Beteiligung desjenigen Gerinnungsfaktors, der in dem betreffenden Mangelplasma fehlte, an der Aktivierung des Faktors VII geschlossen. Einen anderen Versuchsansatz wählten ALTMAN und HEMKER (8), SHANBERGE und MATSUOKA (256) sowie SOULIER und PROU-WARTELLE (261): Sie prüften die Aktivierung des Faktors VII nach

Oberflächenkontakt (Kaolin, Bentonit oder Celit) in verschiedenen kongenitalen Mangelplasmen, die durch Zugabe eines Antikoagulans ungerinnbar gemacht worden waren. Während so drei Arbeitsgruppen (140, 141, 256) eine Beteiligung der Faktoren XII, XI, IX und JOHNSTON und HJORT sogar eine Beteiligung des Faktors VIII an der Aktivierung des Faktors VII fanden, konnten ALTMAN und HEMKER (8) sowie SOULIER und PROU-WARTELLE (261) nur eine Beteiligung der Faktoren XII und XI an der Aktivierung des Faktors VII nachweisen. Als Erklärung für diese Unterschiede vermuteten JOSSO und BEGUIN (140), daß ALTMAN und HEMKER (8) bei ihren Untersuchungen Plasma mit einem abnormen Faktor IX benutzt haben könnten (s.S. 27). LAAKE und ØSTERUD (154) zeigten bei ihren Untersuchungen, bei denen sie rein dargestellte Faktoren verwandten, daß alle drei Faktoren (XII, XI, IX) ohne Kalziumionen den Faktor VII aktivieren konnten.

Eine weitere Möglichkeit, den Faktor VII zu aktivieren, ist die kälteinduzierte Aktivierung (Cold Promoted Activation). Sie wurde zuerst von ALEXANDER und LANDWEHR (6) im Jahre 1949 beschrieben, die eine gesteigerte Aktivität von humanem Oxalatplasma bemerkten, wenn dieses längere Zeit in der Kälte gestanden hatte. Diese Aktivitätssteigerung trat nicht auf, wenn das Plasma bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde. SCHROGIE und Mitarb. (249) stellten eine Verkürzung der Thrombotest-Zeit im Plasma von Frauen fest, die orale Kontrazeptiva einnahmen, wenn das Plasma bei 6 - 8°C aufbewahrt wurde. Die Plasmen von Frauen, die keine oralen Konzeptiva nahmen, zeigten dieses Phänomen nicht.

Dieses Verhalten des Plasmas wurde von GJØNAESS genauer untersucht. Als Ursache für die Verkürzung der Thrombotest-Zeit fand er eine Erhöhung der Faktor VII-Aktivität um das 4 - 11fache neben einer unwesentlichen Aktivitätssteigerung anderer Faktoren (98, 101). Die CPA (Cold Promoted Activation) des Faktors VII trat spontan auf bei Frauen in den letzten Schwangerschaftswochen (90%) und bei Frauen, die orale Kontrazeptiva einnahmen (65%); sie kann induziert werden durch die Aktivatoren des Plasmakallikreinsystems (Epsilon-Aminocapronsäure, Aceton, Ellagsäure u.a.) (98, 100, 102). Sie ist stark temperaturabhängig und findet nur im Bereich zwischen -10° und +10°C statt; sie kann durch Inhibitoren wie Sojabohnentrypsininhibitor (SBTI), Limabohnentrypsininhibitor (LBTI), Trasylol verhindert werden (103).

Der durch Kälte induzierte Aktivator entsteht auch in einem Faktor VII-Mangelplasma, sodaß Faktor VII als der Endpunkt der CPA-Reaktion angesehen werden

muß (101). Weiter an dieser Reaktion beteiligt sind Faktor XII und Plasmaprekallikrein (Fletcher Faktor) (99, 101, 102). Die Tatsache, daß die Aktivierung bei $0^{o}C$ abläuft, bei Raumtemperatur jedoch nicht, wird mit der Existenz eines oder mehrerer Inhibitoren erklärt, die bei $0^{o}C$ inaktiviert sind (101, 156).

SAITO und RATNOFF (243) untersuchten die Reihenfolge der dabei ablaufenden Reaktionen mit Hilfe von kongenitalen Mangelplasmen und schlossen auf eine Reaktionssequenz: Faktor XII-Prekallikrein-Faktor VII. Allerdings konnten sie den gereinigten Faktor VII nicht mit einem gereinigten Plasmakallikreinpräparat aktivieren. Dies wurde von LAAKE und ØSTERUD (154) bestätigt, die ebenfalls rein dargestellte Faktoren für ihre Untersuchungen verwandten. Ihr Kallikreinpräparat konnte den Faktor VII nur bei Raumtemperatur aktivieren, nicht dagegen bei $0^{o}C$, wie es bei der CPA der Fall ist. Dagegen fanden sie, daß Plasmin, Faktor XII_a, Faktor XII_f und Faktor IX_a den Faktor VII bei $0^{o}C$ aktivieren konnten. Da nach den Untersuchungen von GJØNAESS aber nur Faktor XII und Plasmaprekallikrein an der CPA-Reaktion beteiligt sind, muß eine der aktivierten Formen des Faktors XII als Faktor VII-Aktivator angenommen werden. Das Plasmaprekallikrein wird dann vielleicht, wie beim Start des Intrinsic Systems (s.S. 12) eine Rolle beim positiven Feedback-Mechanismus der Faktor XII-Aktivierung spielen.

Die CPA ist bis jetzt ein Phänomen, das zusammen mit anderen Veränderungen in vitro im Plasma von schwangeren Frauen und solchen, die orale Konzeptiva einnehmen, beobachtet wird. Ob der CPA ebenso wie der in vitro Aktivierung durch das Intrinsic System auch eine physiologische oder klinische Bedeutung zukommt, bleibt abzuwarten (104, 105).

Nachdem die Möglichkeiten der Aktivierung von Faktor VII durch das Intrinsic System (s.S. 33) und die CPA (s.o.) beschrieben sind, wird deutlich, daß der Begriff "Aktivierung" beim Faktor VII verschiedene Bedeutung haben kann: Einmal ist damit die Komplexbildung des Faktors VII mit Gewebsfaktor gemeint, die eine solche Konformationsänderung im Faktor VII-Molekül hervorruft (106), daß er als aktives Enzym die Umwandlung des Faktors X in Faktor X_a bewirkt. Diese Art der Aktivierung ist reversibel (s.S. 33). Zum anderen wird durch die ablaufende Gerinnung und durch die CPA Faktor VII so in seinen physikochemischen Eigenschaften (153, 287 und S. 19) und seinem biochemischen Reaktionsverhalten verändert, daß er bei der Komplexbildung mit Gewebsfaktor eine hö-

here Aktivität als der unveränderte Plasma-Faktor VII zeigt. Im übrigen sind Serum-Faktor VII und CPA-Faktor VII nicht identisch, wie der unterschiedliche isoelektrische Punkt und die Tatsache zeigen, daß sich Serum-Faktor VII durch den durch Kälte induzierten Aktivator noch weiter aktivieren ließ (153). Die Serum- oder Kälte-Aktivierung wird besonders deutlich, wenn der Test zur Bestimmung der Faktor VII-Aktivität mit Rinderhirnthromboplastin durchgeführt wird (153).

RADCLIFFE und NEMERSON (233) stellten bei Experimenten mit rein dargestellten Faktoren fest, daß Faktor VII durch Faktor X_a und Thrombin aktiviert werden kann. In einer weiteren Reaktion können Faktor X_a und Thrombin eine zweite Peptidbindung im Faktor VII-Molekül spalten, was einen Aktivitätsverlust zur Folge hat. Die Autoren sehen darin einen möglichen Kontrollmechanismus des Intrinsic Systems über das Extrinsic System. Wieweit das für die Gerinnung in vollständigem Plasma zutrifft, ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt.

Durch nicht physiologische Aktivatoren kann Faktor VII ebenfalls aktiviert werden, nämlich durch Trypsin (240) und in 25% Citratlösung (11). Faktor VII wird in 25% NaCitratlösung zu einem aktiven Enzym, ohne daß eine Aktivierung durch den Gewebsfaktor stattfindet. ARONSON und MUSTAFA (11) nehmen an, daß es durch die hohe Salzkonzentration in unspezifischer Weise zu einer Konformationsänderung kommt ähnlich der durch Gewebsfaktor, sodaß Faktor VII zum aktiven Enzym wird.

Aktivierung des Faktors X

Faktor X kann sowohl durch den Gewebsfaktor-Faktor VII-Komplex (Extrinsic Aktivierung) aktiviert werden (77, 136, 138, 232) als auch durch einen Komplex, der aus den Faktoren IX_a, VIII, Phospholipid und Kalziumionen (Intrinsic Aktivierung) gebildet wird (77, 107, 232, 270, 280). Auf unphysiologische Weise kann Faktor X durch Trypsin (20, 72, 219, 232), durch ein Enzym im Gift der Vipera Russeli (RVV) (17, 72, 160) und in 25% Citratlösung (11, 232) aktiviert werden. Die Aktivierung geht mit einer Reduktion des Molekulargewichts und des Kohlehydratgehaltes einher (s.S. 20).

Zur Untersuchung der Veränderungen am Faktor X-Molekül bei der Aktivierung wurde hauptsächlich boviner Faktor X verwendet. Bei diesen Untersuchungen wur-

den gereinigte Faktorenpräparate verwandt; im Faktor X-Präparat befand sich dabei eine zweikettige Molekülspezies. Da nach MATTOCK und ESNOUF (187) im Plasma eine einkettige Form des Faktors X vorkommt, die erst bei der Isolierung in die zweikettige Form übergeht, muß bei einer Aktivierung in vivo außer den unten beschriebenen Reaktionen noch eine zusätzliche Spaltung einer Peptidbindung stattfinden. Am Ende der Aktivierungsreaktionen steht, gleich welche der oben erwähnten Aktivierungsmethoden gewählt wurde, ein Faktor X_a, bei dem vom Amino- und vom Carboxylende der schweren Kette je ein Peptid abgespalten wurde (20, 77, 79, 83, 135, 137, 138, 232). JESTY und ESNOUF (135) fanden zusätzlich noch eine Peptidabspaltung von der leichten Kette.

Die Entwicklung der enzymatischen Aktivität ist mit der Abspaltung des "activation peptide" vom Aminoende der schweren Kette, das ein MG von 11 000 hat und den größten Teil des Kohlehydratgehaltes des Faktors X trägt (77, 79, 83), verbunden (77, 79, 83, 135, 138, 232). Die Abspaltung eines Peptides vom Carboxylende, die autokatalytisch durch Faktor X_a erfolgt (137, 138), bewirkt keine Änderung der enzymatischen Aktivität. Die Reihenfolge beider Reaktionen kann bei den verschiedenen Aktivierungsarten wechseln.

Aktivierung des Faktors II

Prothrombin wird durch einen Komplex aus Faktor X_a, Faktor V, Phospholipid und Kalziumionen aktiviert (20, 135, 175) (s. Abb. 1). Zusätzlich kann Prothrombin durch Trypsin (240) oder in 25% Natrium-Citratlösung (250) aktiviert werden. Die Aktivierung in Natrium-Zitrat ist nur in der Anwesenheit von Faktor X möglich (22, 23, 160).

Wie beim Faktor X wurde auch der Mechanismus der Aktivierung und die Charakterisierung der auftretenden Molekülbruchstücke zuerst mit bovinem Prothrombin untersucht.
Durch kombinierte Einwirkung vom Faktor X_a und Thrombin entstehen im Verlauf der Aktivierung in vitro 4 Bruchstücke, von denen 3 bereits erwähnt wurden: Intermediate 3, 4 und 2 (s.S. 18). Das vierte Bruchstück ist das Intermediate 1, das sich aus Intermediate 2 und 4 zusammensetzt.
Faktor X_a wirkt an zwei Stellen auf das Prothrombinmolekül ein: Er spaltet die Peptidbindung zwischen den Intermediates 4 und 2 und wandelt das Intermediate 2, das aus einer Peptidkette besteht und keine enzymatische Aktivität besitzt, ebenfalls durch Spaltung einer Peptidbindung in das zweikettige α-Thrombin

um (20, 69, 118, 119, 268). Bei dieser letzten Reaktion kommt es zu keiner Reduktion des Molekulargewichtes (216). Das nach der Spaltung durch Faktor X_a übrigbleibende Bruchstück besteht aus den Intermediates 3 und 4; es wird auch als Prothrombinfragment 1 · 2 bezeichnet.

Durch Thrombin wird die Bindung zwischen dem Intermediate 3 und 4 gespalten; in einem Reaktionsgemisch, in dem sich kein Faktor X_a befindet, entsteht bei dieser Reaktion Intermediate 3 und Intermediate 1 (bestehend aus Intermediate 2 und 4) (35, 216, 268). Intermediate 3, das im vollständigen Molekül die Kalzium- und Phospholipidbindung vermittelt (s.S. 18), wirkt als Bruchstück als kompetitiver Inhibitor der weiteren Prothrombinaktivierung (35, 119, 135). ARONSON und Mitarb. (12) fanden bei der Aktivierung von Prothrombin in normalem Humanplasma als Hauptspaltprodukt des Prothrombins das Prothrombinfragment 1 · 2. Sie schlossen daraus, daß in einem Milieu, das genügend Thrombininhibitoren enthält, nur wenig Intermediate 3 durch Thrombin abgespalten wird. Dementsprechend gering ist deshalb auch die physiologische Bedeutung eines Feedback-Mechanismus, der über eine Thrombin-gesteuerte Bildung eines Inhibitors (Intermediate 3) die Bildung des Thrombins regeln soll (12).

DOWNING und Mitarb. (62) untersuchten die Aktivierung von menschlichem Prothrombin und beschrieben das Auftreten von Aktivierungsprodukten, die sich nach Molekulargewicht, Aminosäuregehalt, physikochemischem und biochemischem Verhalten nicht von ihren bovinen Äquivalenten unterschieden. Der einzige Unterschied zwischen der bovinen und der humanen Prothrombinaktivierung besteht in einer zusätzlichen Abspaltung eines Peptids aus 13 Aminosäuren vom humanen Prethrombin 2 (Intermediate 2).

4 Bestimmungsmethoden

4.1 Übersicht

Gerinnungsfaktoren sind Proteine, die nur in sehr geringen Mengen im Plasma vorkommen (Spurenproteine, s.S. 18, 19, 20). Ihr quantitativer Nachweis ist deshalb mit chemischen Methoden sehr schwierig. Stattdessen wird im Routinebetrieb die biologische Aktivität bestimmt, wie es auch zum Nachweis von anderen Enzymen im Plasma oder Serum (GOT, GPT, etc.) üblich ist. Bei den meisten der heute gebräuchlichen gerinnungsanalytischen Methoden kann die Aktivität der Faktoren nicht direkt gemessen werden. Die einzelnen Aktivitäten werden vielmehr in einem Reaktionsgemisch, in dem mehr oder weniger die gesamte Reaktionskette abläuft, bestimmt. Diese Bestimmungen können nach verschiedenen Prinzipien erfolgen; im allgemeinen werden Ein- oder Zweistufen-Methoden verwendet. In den zweistufigen Methoden, die heute vorwiegend für kinetische Untersuchungen eingesetzt werden, wird der zu bestimmende Gerinnungsfaktor zuerst aktiviert; in einem zweiten Schritt wird dann die Menge des aktivierten Faktors bestimmt. Ein Beispiel hierfür ist die Zweistufen-Bestimmung des Faktors II nach WARE und SEEGERS (291): Es wird ein Reaktionsgemisch aus defibriniertem Plasma, in dem außer Fibrinogen alle Gerinnungsfaktoren enthalten sind, Kieselgel, Gewebsthromboplastin, Kalzium sowie zusätzlich einem Faktor V-Präparat gebildet. Dabei wird das aus dem defibrinierten Plasma stammende Prothrombin aktiviert. Aus dem Aktivierungsgemisch werden in Minutenabständen Proben entnommen; das in ihnen enthaltene Thrombin bringt eine Fibrinogenlösung zum Gerinnen. Aus der Gerinnungszeit wird mit Hilfe einer Bezugskurve die Aktivität des entstehenden Thrombins berechnet, aus der wiederum auf die Menge des im defibrinierten Plasma enthaltenen Prothrombins geschlossen werden kann. Da kontinuierlich bis zur maximalen Aktivierung aus dem Aktivierungsgemisch Proben entnommen werden, gibt der Test Auskunft über die Menge des Prothrombins und über die Geschwindigkeit der Aktivierung.

Die Entwicklung der einstufigen Methoden geht auf ein Prinzip zurück, das QUICK (231) im Jahre 1935 entwickelte. Er ging dabei von der damals gültigen MORAWITZ'schen Vier-Faktoren-Theorie aus, nach der aus Prothrombin (Faktor II) unter Mitwirkung von Thromboplastin (Faktor III) und Kalzium (Faktor IV) Thrombin gebildet wird. Das Thrombin wandelte dann in einem zwei-

ten Reaktionsschritt Fibrinogen (Faktor I) in Fibrin um.

QUICK stellte die These auf, daß die Geschwindigkeit der Thrombinbildung nur von der Konzentration des Prothrombins abhängig ist, wenn man gewährleistet, daß die drei anderen Faktoren (Thromboplastin, Kalzium und Fibrinogen) in optimalen Mengen im Aktivierungsgemisch vorhanden sind. Die optimale Konzentration an Kalzium wurde durch Zugabe von 0,1ml 0,025M $CaCl_2$-Lösung zum Oxalatplasma erreicht, der Überschuß an Thromboplastin mit einem Präparat aus Kaninchengehirn. Unter der Voraussetzung, daß die Fibrinogenkonzentration konstant blieb, war die Prothrombinkonzentration die einzige Variable in diesem Testsystem, deren Höhe allein für die Gerinnungszeit ausschlaggebend sein sollte.

Nach der Entdeckung, daß noch weitere Faktoren am Gerinnungsablauf beteiligt sind, wurde klar, daß die QUICK'sche Methode keine spezifische Methode zur Bestimmung des Prothrombins sein konnte. Die Spezifität wird erst erreicht, wenn alle anderen an der jeweiligen Gerinnungsreaktion (Extrinsic bzw. Intrinsic Aktivierung) beteiligten Faktoren im Überschuß im Testsystem vorhanden sind. Diese Forderung hat als QUICK'sches Prinzip Geltung für alle Einstufen-Methoden. Bei den Einstufen-Methoden wird diese Forderung durch Zugabe eines spezifischen Substratplasmas erfüllt.

Mit den Ein- und Zweistufen-Methoden wird die Aktivität eines Gerinnungsfaktors nur indirekt gemessen. Seit 1972 (272) werden Methoden beschrieben, die eine direkte Messung der Aktivität erlauben. Hierbei werden künstliche Oligopeptid-Substrate verwendet, deren Aminosäuresequenz an der Spaltstelle durch das jeweilige Enzym mit einer chromogenen Gruppe, z.B. p-Nitroanilin, gekoppelt sind. Beispiele für diese Oligopeptide, die sich im wesentlichen in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden, sind die als S-2160 (Benzoyl-L-Phenylalanin-Valin-Arginin-p-Nitroanilid), als S-2222 (Benzoyl-Isoleucin-Glutaminsäure-Glycin-Arginin-p-Nitroanilid) und als S-2251 (H-D-Valin-Leucin-Lysin-p-Nitroanilid-2HCl) bezeichneten chromogenen Substrate. Die aktivierten Gerinnungsfaktoren Thrombin, Faktor X_a, aber auch Plasmin und Trypsin spalten aus den für sie spezifischen Substraten die chromogene Gruppe ab, wodurch eine im Photometer gewöhnlich bei 400 bis 410 nm gemessene Farbänderung verursacht wird (26, 270, 272, 273). Bei der Synthese derartiger Oligopeptide wurde die "susceptible structure", d.h. die Aminosäure-Sequenz der Stelle, an der das Substrat gespalten wird, der natürlichen Substrate als Vorbild für die als "Kleinmodelle" zu betrachtenden chromogenen Substrate genommen (40, 273).

Die Enzymspezifität dieser Substrate ist jedoch nicht absolut (270).

4.2 Prinzip der Einstufen-Methoden

Entsprechend dem Ziel dieser Arbeit, spezifische Mangelplasmen für Einstufen-Methoden zu entwickeln, soll im folgenden näher auf den Aufbau dieser Methoden eingegangen werden.

Die Aktivierung des Gerinnungssystems und daraus folgend die Bildung von Thrombin und Fibrin kann auf zwei verschiedenen physiologischen Wegen erreicht werden: Über das Extrinsic- und über das Intrinsic-System (s. Abb. 1). Die Intrinsic-Aktivierung wird durch Zugabe von Phospholipiden (partiellem Thromboplastin) als Plättchenfaktor 3-Ersatz und Kalzium zum Plasma erreicht, die Extrinsic-Aktivierung durch Zugabe von Gewebsfaktor (Gewebsthromboplastin) und Kalzium. Die beiden daraus resultierenden Gruppentests sind unter der Bezeichnung partielle Thromboplastinzeit (PTZ bzw. engl. PTT) und Thromboplastinzeit (TPZ, QUICK-Test) bekannt. In die partielle Thromboplastinzeit gehen die Aktivitäten des Plasmakallikreins (Fletcher Faktor), des HMWK (Fitzgerald Faktor), und der Faktoren XII, XI, IX, VIII, X, V, II und I ein, in die Thromboplastinzeit die Aktivitäten der Faktoren VII, X, V, II und des Fibrinogens.

Die spezifischen Einstufen-Methoden sind - mit Ausnahme der Methoden, bei denen Schlangengifte zur Aktivierung verwendet werden (s.u.) - Modifikationen eines dieser beiden Gruppentests (50: S. 316), wobei die Einstufenbestimmungen der Faktoren des Intrinsic-Systems Modifikationen der PTT sind und die Methoden zur Bestimmung des Faktors VII sich von der Thromboplastinzeit ableiten. Zur Bestimmung der Faktoren, die beiden Systemen angehören (X, V, II), können im Prinzip Modifikationen beider Gruppenteste angewendet werden. Um durch die genannten Modifikationen eine Spezifität der Methode für einen einzigen Faktor zu erreichen, müssen gemäß dem Quick'schen Prinzip alle übrigen beteiligten Faktoren im Überschuß vorhanden sein (231).
Dies wird durch Zugabe eines spezifischen Mangel- oder Substratplasmas zum Reaktionsgemisch erreicht, in dem alle für die Reaktion erforderlichen Gerinnungsfaktoren vorhanden sind. Zur Erhöhung der Spezifität sowie der Empfindlichkeit der Methode wird die zu untersuchende Plasmaprobe vor der Zugabe zum Reaktionsgemisch verdünnt. Nach dem Zusammengeben der verdünnten Plasmaproben,

des Mangelplasmas und des Gewebsthromboplastins bzw. der Phospholipide wird durch Zugabe der Kalziumionen die Reaktion gestartet. Bei manchen Methoden macht man sich die Eigenschaften von Enzymen aus Schlangengiften zunutze, die in der Lage sind, bestimmte Gerinnungsfaktoren zu aktivieren. Dies gilt für die Aktivierung des Prothrombins sowie des Faktors X (s. Tab. 1 und 3). Durch die direkte Aktivierung der betreffenden Gerinnungsfaktoren kommt eine Verkürzung des Reaktionsablaufs zustande; dadurch wird erreicht, daß diese Methoden nicht von den Gerinnungsfaktoren, die in der Reaktionssequenz vor dem durch das Enzym aktivierbaren Faktor stehen, beeinflußt werden. Das Mangelplasma muß daher diese Faktoren nicht enthalten.

Als Substratplasmen können Plasmen von Patienten mit einem kongenitalen Mangel eines Gerinnungsfaktors verwendet werden; die Restaktivität des betreffenden Faktors sollte unter 1% der Norm liegen. Es können nicht nur menschliche Defektplasmen verwendet werden, sondern auch Plasmen von Tieren mit angeborenen Faktor-Defekten. Seit der Entdeckung von Beagle-Stämmen mit Hypoprokonvertinaemie (199, 262) und mit Haemophilie B (198) werden die Plasmen von Beagle-Hunden aus diesen Stämmen als Substratplasmen zur Bestimmung der Faktoren VII und IX eingesetzt (86, 109). Mit Ausnahme der menschlichen Haemophilien A und B sowie der Faktor VII- und Faktor IX-Mängel beim Beagle sind kongenitale Faktordefekte sehr selten. Für Routineuntersuchungen stehen deshalb natürliche Mangelplasmen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung. Somit ist man auf artifizielle Mangelplasmen angewiesen, aus denen die Aktivität des betreffenden Faktors entfernt wird.

Das kann einmal dadurch geschehen, daß ein Gerinnungsfaktor durch Adsorptionsverfahren abgetrennt wird bzw. durch einen Alterungsprozeß oder einen Enzyminhibitor inaktiviert wird; zum anderen kann ein Plasma aus verschiedenen vorher isolierten Plasmakomponenten so zusammengesetzt werden, daß ein spezifisches Mangelplasma resultiert.

4.3 Bekannte Einstufen-Methoden zur Bestimmung der Faktoren II, VII und X

In den folgenden Tabellen sind bekannte spezifische Einstufen-Methoden zur Bestimmung der Faktoren II, VII, X zusammengestellt. Dabei wird eine kurze Beschreibung der Herstellung und der Zusammensetzung der Mangelplasmen gegeben.

Ein (-) in den Spalten der Tabellen, die die Zusammensetzung der Mangelplasmen angeben, bedeutet, daß der betreffende Faktor im Mangelplasma nicht vorhanden und/oder für die Spezifität der Methode nicht erforderlich ist.

Autoren:	Beschreibung des Prinzips der Mangelplasma-herstellung	Herkunft der Faktoren: I	V	VII	X	Aktivierung des Testsystems:
KOLLER und Mitarb. 1951 (150)	Humanserum wird zu kalziumphosphatadsorbiertem Rinderplasma gegeben	kalziumphosphat-adsorbiertes Rinderplasma		Humanserum		Gewebsthrombo-plastin, Kalzium
PECHET 1964 (220)	Humanserum wird zu $BaSO_4$-adsorbiertem Rinderplasma gegeben	$BaSO_4$-adsorbiertes Rinderplasma		Humanserum		Gewebsthrombo-plastin, Kalzium
JOBIN und ESNOUF 1966 (139)	Verwendung von $BaSO_4$-adsorbiertem Rinderplasma als Substrat	$BaSO_4$-adsorbiertes Rinderplasma		-	-	Gift der Tiger-schlange*, Phospho-lipide, Kalzium
DENSON und Mitarb. 1971 (51)	Verwendung von Rinderfibrinogen oder $BaSO_4$-adsorbiertem Rinderplasma als Substrat	$BaSO_4$-adsor-biertes Plasma	-	-	-	Gift der Taipan-schlange+, Phospho-lipide, Kalzium

* Das Gift der Tigerschlange (Notechis scutatus scutatus) aktiviert Prothrombin in Gegenwart von Kalzium, Phospholipid und Faktor V

+ Das Gift der Taipanschlange (Oxyuranus scutellatus) aktiviert Prothrombin in Gegenwart von Phospholipid und Kalzium

Tab. 1: Spezifische Faktor II-Einstufen-Methoden unter Verwendung artifizieller Mangelplasmen

Autoren:	Beschreibung des Prinzips der Mangelplasma-herstellung	Herkunft der Faktoren: I	V	VII	X	Aktivierung des Testsystems:
VERMEER und Mitarb. 1977 (283)	Aktivierung von Prothrombin in bovinem oder humanem Plasma durch das Gift der Echis carinatus; Trennung der Faktoren VII und X von Thrombin und dem Gift durch Adsorption an DEAE-Sephadex und anschließende Elution. Das Eluat wird dialysiert und zu humanem oder bovinem $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma gegeben	$BaSO_4$-adsorbiertes Plasma		durch Chromatographie an DEAE-Sephadex hergestellte Serumfraktion		Gewebsthrombo-plastin, Kalzium
SEEGERS und Mitarb. 1977 (253)	Adsorption des Prothrombins aus bovinem Plasma durch einen spezifischen an Agarose gebundenen Antikörper	AK-behandeltes Rinderplasma				Gewebsthrombo-plastin, Kalzium

Tab. 1 Forts.: Spezifische Faktor II-Einstufen-Methoden

Autoren:	Beschreibung des Prinzips der Mangelplasma-herstellung:	Herkunft der Faktoren: I	V	II	X	Aktivierung des Testsystems:
DENSON 1961 (47)	Herstellung eines F.X-Präparates durch Papierelektrophorese eines Faktorenkonzentrates aus Humanserum, das durch Adsorption an $BaSO_4$ und anschließende Elution gewonnen wurde; Zugabe dieses Präparates zu asbest- oder holzkohlefiltriertem Rinderplasma	asbest- oder holzkohlefiltriertes Rinderplasma			Elektro-phorese-präparat	Gewebsthrombo-plastin, Kalzium
LOELIGER und Mit-arb. 1963 (170)	dreitägige Behandlung eines Probanden mit extrem hohen Dosen von Sintrom. Blutentnahme am dritten Tag; zu diesem Zeitpunkt ist wegen der kurzen Halbwerts-zeit die Aktivität des F.VII auf unter 1% abgesunken, während die Faktoren II und X noch eine Aktivität von 30% haben	Zitratplasma eines mit hohen Dosen von Sintrom behandelten Probanden				Gewebsthrombo-plastin, Kalzium

Tab. 2: Spezifische Faktor VII-Einstufen-Methoden unter Verwendung artifizieller Mangelplasmen

Autoren:	Beschreibung des Prinzips der Mangelplasma-herstellung:	Herkunft der Faktoren: I	V	II	X	Aktivierung des Testsystems:
SHAW und Mitarb. 1966 (259)	Herstellung eines F.X-Präparates durch PVC-Elektrophorese eines Faktorenkonzentrates aus Humanserum, das durch Adsorption an $BaSO_4$ und anschließende Elution gewonnen wurde; Zugabe dieses Präparates zu holzkohlefiltriertem Rinderplasma	holzkohlefiltriertes Rinderplasma			Elektrophoresepräparat	Gewebsthromboplastin, Kalzium
CASILLAS und Mitarb. 1969 (36) LECHNER und DEUTSCH 1969 (161) HEMKER und Mitarb. 1972 (123)	Herstellung eines F.II/F.X-Konzentrates durch Chromatographie von humanem Zitratplasma an DEAE-Cellulose; Zugabe dieses Konzentrates zu $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma	$BaSO_4$-adsorbiertes Plasma		durch Chromatographie an DEAE-Cellulose hergestellte Plasmafraktion		Gewebsthromboplastin, Kalzium

Tab. 2 Forts.: Spezifische Faktor VII-Einstufen-Methoden

Autoren:	Beschreibung des Prinzips der Mangelplasma-herstellung:	Herkunft der Faktoren: I	V	II	X	Aktivierung des Testsystems:
FUJIKAWA und Mitarb. 1974 (76,77,78)	Reindarstellung von F.II und F.X aus Rinderplasma. Zugabe dieser Faktoren zu $BaSO_4$- oder $Al(OH)_3$-adsorbiertem Plasma	$BaSO_4$- oder $Al(OH)_3$-adsorbiertes Plasma		F.II-Präparat	F.X-Präparat	Gewebsthromboplastin, Kalzium
NEMERSON und CLYNE 1974 (204)	Inaktivierung von F.VII in Rinderplasma durch DFP	bovines, DFP-behandeltes Zitratplasma				Gewebsthromboplastin, Kalzium

Tab. 2 Forts.: Spezifische Faktor VII-Einstufen-Methoden

Autoren:	Beschreibung des Prinzips der Mangelplasma-herstellung:	Herkunft der Faktoren: I	V	II	VII	Aktivierung des Testsystems:
BACHMANN und Mitarb. 1957/58 (17,18)	Asbestfiltration von Rinderplasma	asbestfiltriertes Rinderplasma			-	Gift der Vipera Russelli+, Phospholipide, Kalzium
SISE und Mitarb. 1957 (260)	Asbestfiltration von Rinderplasma	asbestfiltriertes Rinderplasma			-	Gift der Vipera Russelli+, Phospholipide, Kalzium
DENSON 1961 (47)	Asbest- oder Holzkohlefiltration von Rinderplasma	asbest- oder holzkohlefiltriertes Rinderplasma			-	Gift der Vipera Russelli+, Phospholipide, Kalzium
HOUGIE 1962 (128)	Adsorption der Faktoren I,V,VII und X aus humanem Zitratplasma an Bentonit; Zugabe des bentonitadsorbierten Plasmas zu $Al(OH)_3$-adsorbiertem Plasma	$Al(OH)_3$-adsorbiertes Plasma		bentonit-adsorbiertes Plasma	-	Gift der Vipera Russelli+, Phospholipide, Kalzium

+ Das Gift der Vipera Russelli aktiviert Faktor X in Gegenwart von Phospholipiden und Kalzium

Tab. 3: Spezifische Faktor X-Einstufen-Methoden unter Verwendung artifizieller Mangelplasmen

Autoren:	Beschreibung des Prinzips der Mangelplasma-herstellung:	Herkunft der Faktoren:				Aktivierung des Testsystems:
		I	V	II	VII	
HEMKER und Mitarb. 1972 (123)	Herstellung eines F.VII-Präparates aus humanem Zitratplasma durch Chromatographie an DEAE-Cellulose und Ammoniumsulfatfällung; Zugabe dieses Präparates zu asbestfiltriertem Rinderplasma	asbestfiltriertes Rinderplasma			F.VII-Präparat	Gewebsthromboplastin, Kalzium
SEEGERS und Mitarb. 1977 (253)	Adsorption des F.X aus bovinem Plasma durch einen spezifischen an Agarose gebundenen Antikörper	AK-behandeltes Rinderplasma				Gewebsthromboplastin, Kalzium

Tab. 3 Forts.: Spezifische Faktor X-Einstufen-Methoden

5 Eigene Untersuchungen

5.1 Material und Methoden

Soweit im Text nicht anders beschrieben, wurden die folgenden Reagenzien und Methoden angewandt:

Aqua dest: Ampuwa, Fa. Fresenius, Bad Homburg

$BaSO_4$, reinst für Röntgenuntersuchungen, Fa. Merck, Darmstadt

Barbital-Natrium, Fa. Merck, Darmstadt

Chloroform, zur Analyse, Fa. Merck, Darmstadt

Hyflo Super Cel, Partikelgröße 5 - 25µ, Fa. Serva, Heidelberg

HCL, 1 N, Fa. Merck, Darmstadt

Imidazol, zur Analyse, Fa. Fluka, Buchs/Schweiz

tri-Kalziumphosphat, reinst, Fa. Merck, Darmstadt

NaCl, zur Analyse, Fa. Merck, Darmstadt

NaOH, 1 N, Fa. Merck, Darmstadt

Natriumacetat, zur Analyse, Fa. Merck, Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat, zur Analyse, Fa. Merck, Darmstadt

tri-Natriumcitrat 5,5-hydrat, rein, Fa. Riedel-De Haën Ag, Hannover

di-Natriumoxalat, zur Analyse, Fa. Merck, Darmstadt

Tris (hydroxymethyl) aminomethan, zur Analyse, Fa. Merck, Darmstadt

Asbestfilter, K5 ~25% Asbest, K7 ~30% Asbest, Fa. Seitz, Bad Kreuznach

Visking-Dialysierschlauch, Fa. Serva, Heidelberg

Filterpapier, Fa. Carl Schleicher & Schüll, Einbeck

Glaswolle, extra fein, Fa. Hecht, Sondheim

Seesand, mit Säure gereinigt und geglüht, zur Analyse, Fa. Merck, Darmstadt

Silikonöl, AK 350, Synochem Präparate, Berlin

DEAE-Cellulose, Servacel DEAE 23 SS, zur Analyse, Kapazität 0,72 meq/g, Fa. Serva, Heidelberg

DEAE-Sephadex A 25, Kapazität 3,5 ± 0,5meq/g, Fa. Pharmacia, Frankfurt

Sephadex G 25, medium, Fa. Pharmacia, Frankfurt

Russels Viper Venom, Stypven, Fa. Wellcome Reagents Ltd., Beckenham

Calcium-Thromboplastin, Fa. Hoffmann-La Roche, Basel

Calcium-Thromboplastin, Fa. Boehringer, Mannheim

British Comparative Thromboplastin, von Dr. POLLER, National Reference Laboratory for Anticoagulant Reagents and Control, Manchester

Simplastin, Fa. Gödecke, Berlin

Simplastin Automated, Fa. Gödecke, Berlin

Thromboplastin C, Fa. Merz und Dade, München

Rinderfibrinogen, wurde als Fraktion I nach Cohn aus $BaSO_4$-adsorbiertem Rinderplasma hergestellt

Bestimmung der Fibrinogenkonzentration mit einer Modifikation der Methode nach Clauss (41), mit einer Thrombin-Lösung, hergestellt aus Topostasin, Fa. Hoffmann-La Roche, und dem Reagenz der Fa. Christiaens s.a., Brüssel

Bestimmung des Prothrombins nach KOLLER, LOELIGER, DUCKERT (150)

Bestimmung des Faktors V nach BIGGS und MACFARLANE (29)

Bestimmung des Faktor VII-Komplexes nach KOLLER, LOELIGER, DUCKERT (150)

Bestimmung des Faktors VII mit kongenitalem humanem Mangelplasma und Thromboplastin C der Fa. Merz und Dade, München, nach Vorschrift des Herstellers

Bestimmung des Faktors X nach BACHMANN, DUCKERT, KOLLER (18)

Bestimmung des Faktors X mit humanem Mangelplasma und Thromboplastin C der Fa. Merz und Dade, München, nach Vorschrift des Herstellers

Bestimmung des Faktors X mit kongenitalem humanem Mangelplasma der Fa. Behringwerke, Marburg

Qualitative Untersuchung auf Thrombinaktivität in chromatographierten Fraktionen: 0,2ml der zu untersuchenden Fraktion, 0,2ml Michaelispuffer pH 6,8, und 0,2ml einer 0,35% Rinderfibrinogenlösung wurden bei 37°C bis zu 2 Stunden lang inkubiert. Eine Leerkontrolle mit 0,2ml Rinderfibrinogenlösung und 0,4ml Puffer wurde mitgeführt. Das Erscheinen eines Gerinnsels im Testgemisch zeigt das Vorhandensein von Thrombin an.

Allgemeiner Testansatz für Einstufen-Bestimmungen mit der manuellen Häkchentechnik

0,1ml Substratplasma
0,1ml Testplasmaverdünnung
30" Inkubation bei 37°C
0,2ml Calcium-Thromboplastin Roche

Mechanische Bestimmung der Gerinnungsfaktoren mit dem Gerinnungsautomaten Auto-Fi der Fa. Merz und Dade AHS, Miami, Fla.

Herstellung des humanen Normalplasma-Pools, der als Referenzplasma und für chromatographische Versuche verwendet wurde:
Das Blut von mindestens 3 männlichen Blutspendern wurde nach der Blutspende durch das noch in der Vene liegende Blutentnahmegerät (Fa. Dubernard Hospital GmbH, Erkrath-Unterfeldhaus) unter Vorlage von 1 ml 0,1 M (3,8%) Natrium-Zitratlösung in Einmalspritzen bis zum Endvolumen von 10ml Zitratblut aufgezogen. Das Blut wurde in Kunststoffröhrchen 10 Minuten bei 3000 x g, 10°C zentrifugiert, die Plasmen abgehebert, gepoolt und im Kunststoffröhrchen aufbewahrt.

Gewinnung von Humanplasma für chromatographische Versuche:
Für derartige Versuche wurde entweder der oben erwähnte Plasmapool verwendet oder es wurde Spendern 450ml venöses Blut mittels des Vakuum-Entnahmeverfahrens (gesteuertes Vakuum nach Dr. Kolb) in silikonierte Glasflaschen, in denen 50ml 0,1 M Natrium-Zitratlösung vorgegeben waren, entnommen.
Das Blut wurde 30 Min. bei 3000 x g zentrifugiert, das Plasma abgehebert; dieses Plasma wurde ein zweites Mal 30 Min. bei 3000 x g zentrifugiert und das überstehende Plasma abgehebert.

Gewinnung von Tierplasmen für chromatographische Versuche:
Das Blut wurde beim Schlachten der Tiere aus der Vena jugularis in freiem Strahl in Glasflaschen von 1 Liter Fassungsvermögen, in denen 110ml 3,8% Natrium-Zitratlösung bzw. 110ml 1,34% Natrium-Oxalatlösung vorgegeben waren, aufgefangen. Das Tierplasma wurde wie das Humanplasma durch zweimaliges Zentrifugieren bei 3000 x g gewonnen.

Silikonierung
Das Material bzw. die Glaswaren wurden mit einer 2% Lösung des Silikonöls in Chloroform benetzt, anschließend 5 Stunden auf 200°C erhitzt.

Chromatographie

Die säulenchromatographischen Versuche wurden mit einem Fraktionssammler mit Kühleinheit und Einrichtung zur Messung der UV-Absorption bei 254 nm zum Proteinnachweis der Fa. LKB-Colora, Stockholm und Lorch, durchgeführt. Die zur Chromatographie verwandten Glassäulen hatten einen Kühlmantel, um die Untersuchungen bei definierten Temperaturen durchführen zu können. Es wurden Säulen mit einem Durchmesser von 10mm für Adsorbensmengen ≦ 1g verwendet, mit einem Durchmesser von 15mm für Adsorbensmengen von 1 - 5g; für Adsorbensmengen ≧ 20g wurden Säulen mit einem Durchmesser von 35mm verwendet. Das untere Ende der Säulen mit 10mm und 15mm Durchmesser wurde durch Glasfritten gebildet; zur Vermeidung einer Verstopfung dieser Fritten durch Adsorbens wurde vor der Packung der Säulen ein Filterpapier auf die Fritten gelegt. Der untere Abschluß der 35mm-Säule, die keine Fritte besaß, wurde auf folgende Weise erreicht: In den unteren Konus der Säule wurde eine Schicht silikonierte Glaswolle gestopft; darüber wurde eine Schicht Seesand und zum Schutz der Seesandschicht beim Packen der Säule ein Filterpapier gebracht. Zur Entfernung von Luftblasen waren Seesand und silikonierte Glaswolle in kochendes Wasser gelegt worden; erst nach dem Abkühlen wurden sie in die Säule gebracht.
Die Ionenaustauscher (DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex A 25) und das neutrale Sephadex-Gel G 25 wurden nach ausreichendem Quellen (24 Stunden) im Startpuffer in die so vorbereiteten Säulen gepackt. Zum Schutz der Adsorbensschicht wurde ein zweites Filterpapier auf die Oberfläche der Säule gelegt und vorsichtig festgedrückt.
Vor der Chromatographie wurde die Säule mit dem Startpuffer äquilibriert. Die zu trennenden Lösungen wurden vorsichtig auf die äquilibrierte Säule aufgetragen; das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt. Die Fließgeschwindigkeit bei der Chromatographie betrug zwischen 5 und 15ml/h/cm^2.

Asbestfiltration:

Ein Asbestfilter mit einem Asbestgehalt von 30% (K7) und darüber ein Filter mit einem Gehalt von 25% (K5) wurden in ein Seitz-Filtergerät eingespannt. 2000ml Oxalatplasma verschiedener Spezies wurden jeweils in das Filtergerät gefüllt. Dann wurde durch Überdruck, der durch eine an das Filtergerät angeschlossene N_2-Gasflasche erzeugt wurde, die Filtrationsgeschwindigkeit so reguliert, daß 60 Tropfen/min. filtriert wurden. Diese Filtrationsgeschwindigkeit hatte sich bei der Präparation von bovinem Faktor VII/X-Mangelplasma nach der Methode von BACHMANN und Mitarb. (18) als günstig erwiesen.

Graphische Darstellung der Ergebnisse:

Die Ergebnisse der chromatographischen Versuche wurden graphisch dargestellt, wobei auf der Abszisse die Fraktionen und auf der Ordinate die Aktivität der Gerinnungsfaktoren bzw. die Fibrinogenkonzentration in mg/100ml aufgetragen wurden. Die Aktivität der humanen und auch der tierischen Gerinnungsfaktoren wurde ausgedrückt in Prozent der Aktivität eines humanen Zitratplasmapools, wobei die Aktivität der Faktoren in diesem Pool gleich 100% gesetzt wurde. In allen Abbildungen mit Ausnahme der Abb. 2 wurden für die Darstellung der Faktoren jeweils folgende Symbole benutzt:

Fibrinogen ▵—▵—▵
Faktor II x—x—x
Faktor V ·—·—·
Faktor VII ●—●—●
Faktor X ○—○—○

Die Aktivität eines mit einer Einstufen-Methode bestimmten Gerinnungsfaktors wird anhand von Bezugskurven ermittelt; die Bezugskurven geben die Beziehung zwischen der Gerinnungszeit der Methode und der Aktivität des zu bestimmenden Faktors an. Zur Erstellung einer solchen Bezugskurve wurden die Gerinnungszeiten verschiedener Verdünnungen eines humanen Plasmapools in der jeweiligen Methode gemessen. Verdünnung und zugehörige Gerinnungszeit wurden im doppelt logarithmischen Koordinatensystem aufgetragen, wobei die Entfernung eines Punktes von der Ordinate die Aktivität der Verdünnung in Prozent der Aktivität eines humanen Plasmapools angibt, die Entfernung von der Abszisse die Gerinnungszeit. Dabei wurde eine 10-fache bzw. in einigen Versuchen eine 20-fache Verdünnung des humanen Plasmapools als 100%-Wert eingesetzt.

Die Verbindung der auf diese Weise erhaltenen Punkte bildet eine Gerade, wobei die Punkte je nach der im Testsystem noch enthaltenen Restaktivität des zu bestimmenden Faktors früher oder später von der Geraden abweichen.

Die Gerinnungszeit des Pufferleerwertes, d.h. des Null-Wertes, wurde als waagerechte Linie in das Diagramm eingezeichnet. Die Bezugskurve und die Waagerechte wurden bis zu ihrem Schnittpunkt verlängert. Die Lage des Schnittpunktes auf der Abszisse ergibt ein zusätzliches Maß für die Restaktivität des Testsystems.

Da meist mehrere Bezugskurven in ein Koordinatensystem gezeichnet wurden, überlappen sich die Aktivitätsbereiche mehrerer Kurven. Daher konnte auf der Abszisse nur der logarithmische Maßstab aufgezeichnet werden; das rechte untere Ende einer jeden Bezugskurve entspricht jeweils dem 100%-Wert.

5.2 Orientierende Versuche

Die Herstellung eines artifiziellen Mangelplasmas zur Einstufen-Bestimmung eines Gerinnungsfaktors erfordert die Trennung dieses Faktors von den anderen Gerinnungsfaktoren (s.S. 42). Eine solche Trennung ist für die Faktoren II, VII und X wegen der engen Verwandtschaft dieser Faktoren besonders schwierig (s.S. 22).

Im ersten Abschnitt des experimentellen Teils wurde daher versucht, zunächst in Anlehnung an die Experimente von LECHNER und DEUTSCH (161), eine Trennung der Faktoren II, VII und X unter Verwendung der Ionenaustauscherchromatographie aus menschlichem Plasma zu erreichen. Anschließend wurden, nunmehr abweichend vom Versuchsansatz von LECHNER und DEUTSCH, Versuche zur Trennung der Faktoren II, VII und X aus Schafs-, Pferde-, Rinder- und Schweineplasma vorwiegend unter Verwendung der Ionenaustauscherchromatographie unternommen. Bei allen Versuchen, mit Ausnahme der Versuche, bei denen die Ergebnisse der Untersuchungen von LECHNER und DEUTSCH sowie von HEMKER und Mitarb. (123) nachgearbeitet werden sollten, wurden die Säulen während der Chromatographie auf $4^{o}C$ gekühlt, um die Gefahr einer Denaturierung der Proteine zu vermindern.

Anschließend wurde die Verwendbarkeit der dabei erhaltenen Plasmafraktionen zur Herstellung von Substratplasmen zur Bestimmung der Aktivität der Faktoren II, VII und X geprüft.

5.2.1 Versuche mit Humanplasma

Zunächst wurde der erste Teil des Versuchs von LECHNER und DEUTSCH (161) zur Herstellung eines Faktor VII-Mangelplasmas nachgearbeitet. Dabei sollten die Faktoren II und X aus humanem Zitratplasma an DEAE-Cellulose gebunden werden, während der Faktor VII nicht an die DEAE-Cellulose-Säule gebunden werden sollte. Durch Elution der gebundenen Gerinnungsfaktoren sollte dann ein nahezu Faktor VII-freies Faktor II/X-Konzentrat hergestellt werden, das sich nach Dialyse gegen einen Natrium-Zitrat/Natrium-Chloridpuffer mit $BaSO_4$-adsorbiertem Rinderplasma zu einem spezifischen Faktor VII-Mangelplasma zusammensetzen läßt (s. auch Tab. 2). Der letzte Versuchsteil (Dialyse und Herstellung des Mangelplasmas) sollte, wie bereits erwähnt, zunächst nicht durchgeführt werden.

1g DEAE-Cellulose wurde in einer Na-Zitrat-NaCl-Lösung aus 1 Teil 3,8% Zitratlösung und 9 Teilen 0,15 M NaCl-Lösung suspendiert. Nachdem die Cellulose ausreichend gequollen war, wurde die Suspension in eine Säule von 10mm Durchmesser gegossen. Über Nacht wurde die Säule mit derselben Zitrat/Kochsalzlösung äquilibriert. Am nächsten Morgen wurden 25 ml eines Pools aus menschlichem Plasma mit 25ml 0,15 M NaCl-Lösung verdünnt. Diese Plasma-Verdünnung wurde auf die Säule aufgetragen. Nachdem das Plasma vollständig in die Säule eingedrungen war, wurde mit einer Lösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 19 Teilen 0,15 M NaCl nachgewaschen, bis kein Protein mehr eluiert wurde. Die Waschflüssigkeit wurde verworfen. Dann wurden die an die Cellulose gebundenen Gerinnungsfaktoren mit einer 1,0 M NaCl-Lösung, die einen 0,02 M Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,0 enthielt, eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug ca. 5ml/h. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 1ml gesammelt.

Nach der Elution der gebundenen Gerinnungsfaktoren von der Ionenaustauschersäule stellte sich heraus, daß Faktor VII scheinbar in einer sehr viel höheren Aktivität an den Ionenaustauscher gebunden wurde, als dies nach den Untersuchungen von LECHNER und DEUTSCH (161) der Fall sein sollte: Die Aktivität des Faktors VII im Eluat betrug zum Teil über 30% von der des Faktors II, während bei den Versuchen von LECHNER und DEUTSCH die Faktor VII-Aktivität in den Eluaten höchstens 1% - 2% der Aktivität des Faktors II betrug.

Eine Wiederholung des Versuchs führte zu ähnlichen Ergebnissen.

HEMKER und Mitarb. (123) hatten ebenfalls eine Vorschrift zur Herstellung eines Faktor VII-Mangelplasmas angegeben, die sich von der Vorschrift von LECHNER und DEUTSCH im wesentlichen nur in der Verwendung einer größeren Plasmamenge und von ACD-Plasma anstelle von humanem Zitratplasma sowie der Verwendung einer größeren Ionenaustauschermenge unterscheidet. Dieser Versuch von HEMKER und Mitarb. wurde ebenfalls nachgearbeitet. Auch hierbei konnte keine vollständige Abtrennung des Faktors VII von den anderen Gerinnungsfaktoren erreicht werden.

Die deutlich anderen Ergebnisse ließen vermuten, daß die Unterschiede zum Teil methodisch bedingt sein könnten: LECHNER und DEUTSCH bestimmten die Faktor VII-Aktivität mit einer Methode unter Verwendung eines kongenitalen Faktor VII-Mangelplasmas, während in den hier beschriebenen Experimenten der Faktor VII mit der Methode von KOLLER und Mitarb. (150) unter Verwendung des asbestfiltrierten Faktor VII/X-Mangelplasmas bestimmt wurde.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde erneut der Versuch von LECHNER und DEUTSCH durchgeführt, wobei neben der Aktivitätsbestimmung der Faktoren II und X die Aktivität des Faktors VII in den Fraktionen des Eluats sowohl mit der KOLLER'schen Methode als auch mit einer Methode unter Verwendung eines kongenitalen Faktor VII-Mangelplasmas bestimmt wurde.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 2 gezeigt. Im Unterschied zu den Untersuchungen von LECHNER und DEUTSCH war die Elutionskurve steiler, d.h. die Aktivität der eluierten Faktoren II und X war höher (400% - 700%), aber auf weniger Fraktionen verteilt. Dieser Unterschied läßt sich zum einen durch die vermutlich höhere Kapazität der hier verwendeten DEAE-Cellulose, zum andern dadurch erklären, daß LECHNER und DEUTSCH das Eluat in größeren Fraktionen (3ml) auffingen und daß so der Eluatanteil mit der höchsten Aktivität durch den nachfolgenden verdünnt wurde. Weiterhin ist erkennbar, daß die Bestimmung des Faktors VII mit einem natürlichen Mangelplasma sehr viel niedrigere Werte als mit der KOLLER'schen Methode ergibt. Gleichzeitig wurde die Aktivität der Faktoren II, VII und X im Plasmavorlauf bestimmt. Dabei konnte Faktor VII mit der Methode unter Verwendung des natürlichen Mangelplasmas nachgewiesen werden. Damit ist dieses Resultat vergleichbar mit den Ergebnissen der Untersuchung von LECHNER und DEUTSCH.

Es stellt sich nun die Frage, weshalb mit der Methode von KOLLER eine sehr viel höhere Faktor VII-Aktivität gemessen wurde als mit der Methode unter Verwendung des natürlichen spezifischen Mangelplasmas. Da das asbestfiltrierte Mangelplasma gleichzeitig auf Veränderungen der Aktivität der Faktoren VII und X reagiert und üblicherweise bei der Erstellung einer Bezugskurve alle Faktoren des Plasmapools verdünnt werden, erschien die Möglichkeit denkbar, daß die KOLLER'sche Methode bei einer im Vergleich zum Faktor VII sehr hohen Faktor X-Aktivität zu hohe Faktor VII-Werte angibt, weil die Bezugskurve bei der gleichzeitigen Anwesenheit von Faktor X anders verläuft.

Diese Vermutung wurde bestätigt anhand eines Vergleichs von Bezugskurven der Methode unter Verwendung des asbestfiltrierten Faktor VII/X Mangelplasmas. Hierbei wurden einmal die Bezugskurven in üblicher Weise erstellt, indem Verdünnungen eines humanen Normalplasmapools mit Michaelispuffer hergestellt wurden (Abb. 3, Kurve b), während ein zweites Mal die Verdünnungen des Plasmapools mit kongenitalem Faktor VII-Mangelplasma hergestellt wurden, sodaß Gemische entstanden, die sich nur durch ihre Faktor VII-Aktivität unterschieden (Abb. 3, Kurve a). Die Aktivitäten der Faktoren II und X im Plasmapool und im

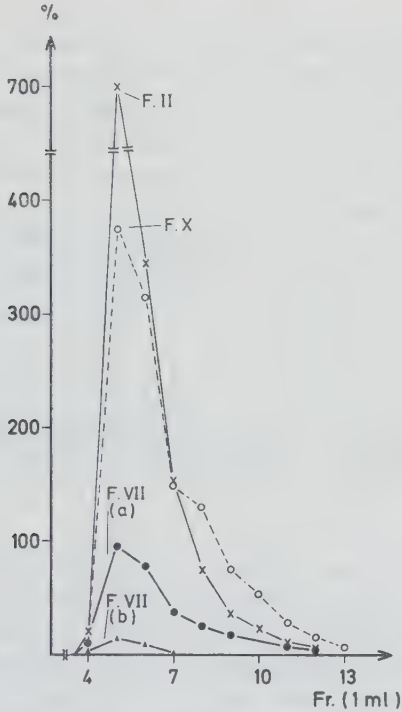


Abb. 2: Versuch zur Präparation eines Faktor II/X-Konzentrates nach LECHNER und DEUTSCH, das sich zur Herstellung eines spezifischen Faktor VII-Mangelplasmas eignet:
25ml humanes Zitratplasma, verdünnt mit 25ml 0,15 M NaCl-Lösung, wurden in 1g DEAE-Cellulose, die mit einer Lösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 9 Teilen 0,15 M NaCl äquilibriert wurde, chromatographiert. Bei diesem Versuch betrug der pH 7,5. Die nicht gebundenen Proteine wurden mit einer Lösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 19 Teilen 0,15 M NaCl ausgewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit einer Pufferlösung aus 0,02 M Natrium-Phosphat, 1,0 M NaCl, pH 7,0, eluiert.
F. VII (a): Aktivität des Faktors VII, gemessen mit der Methode von KOLLER, LOELIGER, DUCKERT (150).
F. VII (b): Aktivität des Faktors VII, gemessen mit einer Methode unter Verwendung eines natürlichen Mangelplasmas.

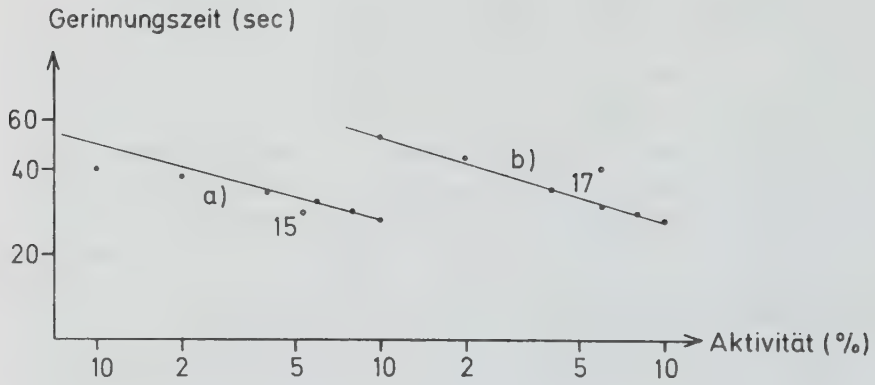


Abb. 3: Vergleich von Verdünnungskurven eines humanen Normalplasmapools mit einem kongenitalen Faktor VII-Mangelplasma (isolierte Verminderung der Faktor VII-Aktivität) (a) und des gleichen Normalplasmapools mit Michaelis-Puffer (gleichzeitige Verminderung der Faktor VII- und Fakto X-Aktivität) (b) in der Faktor VII/X-Bestimmungsmethode mit asbestfiltriertem Rindermangelplasma nach KOLLER und Mitarb. (150)

Zur Erstellung der Kurve a) wurde humaner Plasmapool mit kongenitalem Faktor VII-Mangelplasma derart gemischt, daß die einzelnen Gemische eine Faktor VII-Aktivität von 100%, 80%, 60%, 40%, 20% und 10% aufwiesen. Diese Mischungen wurden 1 + 9 mit Michaelis-Puffer verdünnt, die Faktor VII/X-Bestimmungen mit asbestfiltriertem Mangelplasma nach KOLLER und Mitarb. (150) durchgeführt und die Gerinnungszeiten in üblicher Weise (s. Methoden) gegen die Aktivität aufgetragen. Zur Erstellung der Kurve b) wurde ohne Abweichung von dem im methodischen Teil der Arbeit beschriebenen Vorgehen humaner Plasmapool mit Michaelispuffer verdünnt, die Faktor VII/X-Bestimmungen mit dem asbestfiltrierten Mangelplasma nach KOLLER durchgeführt und die Gerinnungszeiten gegen die Aktivität aufgetragen.
Die Faktor II- und X-Aktivitäten des kongenitalen Faktor VII-Mangelplasmas waren etwa so hoch wie die des humanen Plasmapools, die Faktor V-Aktivität des kongenitalen Faktor VII-Mangelplasmas lag etwa bei 50% der Aktivität des humanen Normalplasmapools.

kongenitalen Faktor VII-Mangelplasma waren vorher überprüft worden, sie stimmten in beiden Plasmen überein. Die Reaktionszeiten dieser Verdünnungen wurden auf übliche Weise gemessen und die Werte im doppelt logarithmischen System aufgetragen. Es zeigte sich, daß bei konstantem Faktor X-Gehalt (Abb. 3, Kurve a) der Neigungswinkel der Bezugskurven zur Abszisse geringer ist, als wenn die Aktivität der Faktoren VII und X gleichzeitig abnimmt (Abb. 3, Kurve b). Außerdem verläuft die Bezugskurve bei konstantem Faktor X-Gehalt der Plasmapoolverdünnungen nur über einen geringeren Aktivitätsbereich linear; im Aktivitätsbereich unter 40% wird sie deutlich flacher.

Das bedeutet, daß die Faktor VII-Aktivitäten, abgelesen auf der Bezugskurve mit nicht Faktor X-substituierten Plasmapoolverdünnungen (Abb. 3, Kurve b), zumindest im unteren Aktivitätsbereich zu hoch angegeben werden, wenn gleichzeitig Faktor X in höherer Aktivität vorhanden ist. Diese Bedingung trifft, wie Abb. 2 zeigt, für die Fraktionen des Eluats, in denen Gerinnungsaktivität enthalten ist, zu.

Die Faktor VII-Aktivitäten, die mit den beiden Methoden gemessen wurden, stimmten jedoch auch dann nicht überein, wenn die Faktor VII-Aktivitäten der KOLLER'schen Methode aufgrund der flacheren Bezugskurve berechnet wurden. Damit reicht die oben angegebene Erklärung für die beobachteten Unterschiede nicht aus.

In einer Reihe weiterer Experimente wurde versucht, durch Modifikationen der Versuchsanordnung von LECHNER und DEUTSCH eine vollständige Abtrennung des Faktors VII zu erreichen. In diesen Versuchen wurden orientierende Messungen der Faktor VII-Aktivität wegen der Knappheit des natürlichen Mangelplasmas weiterhin mit der Methode von KOLLER und Mitarb. durchgeführt.

Die Eigenschaften von Ionenaustauschern lassen mehrere Modifikationsmöglichkeiten des Trennverfahrens zu. Bei der Chromatographie mit Anionenaustauschern sind bei einem pH oberhalb des isoelektrischen Punktes (IEP) die negativ geladenen Proteine durch elektrostatische Kräfte an die positiv geladenen funktionellen Gruppen des Austauscherharzes bzw. -gels gebunden. Eine Loslösung der Proteine vom Gel kann einmal erreicht werden durch einen Überschuß an anderen negativ geladenen Ionen (z.B. Cl^-), die die Proteine aus ihrer Bindung verdrängen. Dabei werden die Proteine je nach ihrer Bindungsstärke bei steigender Konzentration des verdrängenden Anions im Elutionspuffer früher oder später eluiert.

Abb.4

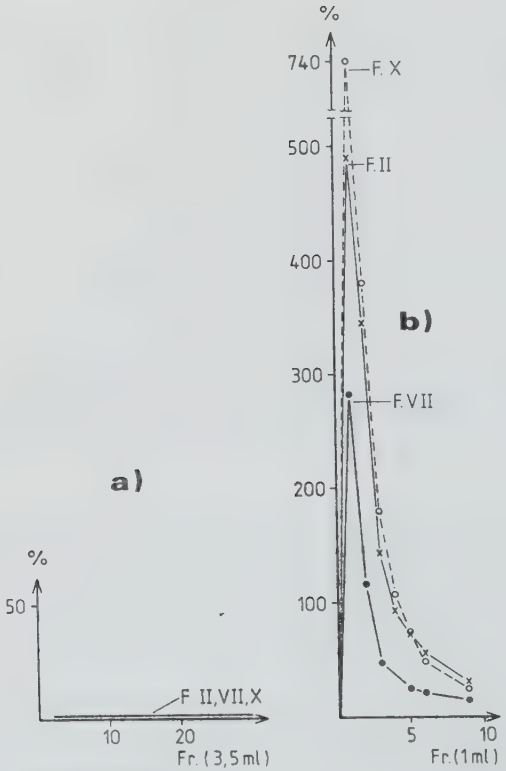


Abb. 4 - 6: Modifikationen des Verfahrens von LECHNER und DEUTSCH:
E r h ö h u n g d e r I o n e n s t ä r k e

Dazu wurden jeweils 25ml humanes Zitratplasma mit 25ml NaCl-Lösung steigender Ionenstärke verdünnt, diese Plasmaverdünnung bei einem pH von 7,5 an DEAE-Cellulose chromatographiert, die mit einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 9 Teilen NaCl-Lösung steigender Konzentration (s.u.) äquilibriert war. Die Entfernung der nicht gebundenen Proteine erfolgte mit einem Puffer aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 19 Teilen der NaCl-Lösung (Konzentration s.u.). Anschließend wurden die gebundenen Proteine wie auf S. 57 und Abb. 2 angegeben eluiert. Abb. 4 - 6 zeigen typische Beispiele dieser Versuchsreihe, wobei die NaCl-Konzentration des in Abb. 4 dargestellten Versuchs 0,16 M betrug, die NaCl-Konzentration in Abb. 5 0,18 M, in Abb. 6

Abb. 5

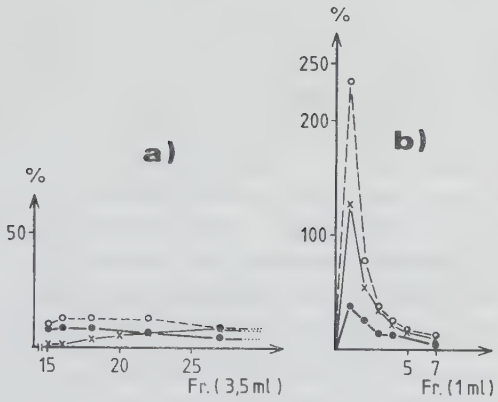
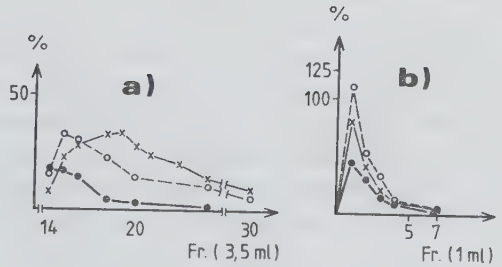


Abb. 6



0,19 M.

Teil a) der Abbildungen zeigt die Chromatographie der verdünnten Plasmen, Teil b) die Elution der gebundenen Faktoren mit einer Pufferlösung aus 0,02 M Natrium-Phosphat, 1,0 M NaCl, pH 7,0.

Wegen der geringen Aktivitäten bei der Chromatographie der verdünnten Plasmen wurde bei a) ein größerer Maßstab gewählt.

Eine andere Möglichkeit ist die Senkung des pH's. Da die Proteine Ampholythe sind, hängt ihre Ladung vom pH ab. Bei einem pH oberhalb des IEP bewirkt eine Senkung des pH eine Abnahme ihrer negativen Ladung und damit eine weniger starke Bindung an die positiv geladenen Gruppen des Austauschergels. Proteine mit einem hohen isoelektrischen Punkt werden bei einer Senkung des pH eher eluiert. Die eben beschriebenen Möglichkeiten sollten in den folgenden Versuchsreihen zur vollständigen Abtrennung des Faktors VII von den Faktoren II und X ausgenützt werden. Dazu wurde die Versuchsanordnung von LECHNER und DEUTSCH insofern modifiziert, als in einer ersten Versuchsreihe bei konstantem pH die Ionenstärke in den Lösungen gesteigert wurde, in einer zweiten Versuchsreihe bei konstanter Ionenstärke der pH der Lösungen gesenkt wurde.

In 4 Versuchen wurde, ausgehend von der ursprünglichen Konzentration von 0,15 M NaCl, die Konzentration der NaCl-Lösung, mit der das Plasma verdünnt und mit der die Natrium-Zitrat/NaCl-Pufferlösungen hergestellt wurden, um jeweils 0,01 M bis zu einer Konzentration von 0,19 M gesteigert. Der pH der Plasmaverdünnungen und der Pufferlösungen betrug 7,5. Die NaCl-Konzentration der Pufferlösung für die Elution blieb unverändert bei 1,0 M, der pH bei 7,0, die Natrium-Phosphat-Konzentration bei 0,02 M.

Wie aus Abb. 4 - 6 zu erkennen ist, erscheinen die Faktoren II, VII und X mit zunehmender NaCl-Konzentration bereits im Vorlauf (a), während ihre Aktivität bei der Elution (b) abnimmt. Eine mehr als geringfügige Veränderung im Verhältnis der Faktoren II/VII und X/VII kann nicht beobachtet werden. Bei dem Versuch mit einer NaCl-Konzentration von 0,17 M war das Verhältnis der Aktivität der Faktoren X/VII allerdings etwas höher als bei den anderen Versuchen. Da aber dieser Unterschied bei der graphischen Darstellung nicht deutlich erkennbar ist, wurde auf eine zusätzliche Abbildung dieses Versuchs verzichtet.

In den 12 Experimenten der zweiten Reihe wurde der pH der Plasmaverdünnung und der Pufferlösung für das Äquilibrieren und Nachwaschen, ausgehend von einem pH von 7,4, um jeweils 0,2 Einheiten gesenkt. Da sich in den Versuchen der ersten Reihe herausgestellt hatte, daß das Verhältnis der Faktoren X/VII bei der Verwendung von 0,17 M NaCl-Lösung geringfügig größer war als bei den anderen, wurde diese Konzentration für die zweite Versuchsreihe gewählt. Die Fließgeschwindigkeiten der Lösungen betrugen zwischen 10 und 25ml/h. Der pH des Elutionspuffers betrug unverändert 7,0, die NaCl-Konzentration 1,0 M.

Aus den Abb. 7 - 9 ist ersichtlich, daß die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe denen der ersten vergleichbar sind: Mit fallendem pH erschienen ab

pH 6,2 die Faktoren II, VII und X im Vorlauf in immer höheren Aktivitäten, während die Aktivität der Faktoren im Eluat immer mehr abnahm. Auch in dieser Versuchsreihe konnte keine Abtrennung des Faktors VII von Faktor II und X erreicht werden; das Verhältnis Faktor X/VII ließ sich nicht verschieben. Eine Senkung des pH's unter den Wert 5,2 war mit dieser Versuchsanordnung nicht möglich, weil denaturiertes Protein in der Säule und in den Schläuchen ausfiel und diese verstopfte.

Schließlich wurde eine dritte Versuchsreihe, in der durch schrittweise Verminderung der DEAE-Cellulose-Menge bei gleichbleibender Plasmamenge die Austauschkapazität der Säulen verringert wurde, durchgeführt, da möglicherweise bei geringerer Austauschkapazität ein Überschuß an Gerinnungsfaktoren und dadurch eine Konkurrenz um die Bindungsstellen aufträte, als deren Folge der Faktor VII vollständig von der Säule verdrängt würde.

Einen ähnlichen Effekt hatte BEESER (22: S. 75 und 79) bei der Adsorption der Vitamin K-abhängigen Faktoren aus humanem und bovinem Plasma an $BaSO_4$ beobachten können. Sobald die Menge des $BaSO_4$ im Verhältnis zur Plasmamenge eine bestimmte Größe unterschritt, wurde nicht nur weniger Prothrombin adsorbiert, sondern die Adsorption der Faktoren VII und X wurde völlig aufgehoben.

Die Austauschkapazität der Säulen wurde vermindert, indem die gleiche Menge Plasmaverdünnung (50ml) auf DEAE-Cellulose-Säulen gegeben wurden, deren Cellulosemenge jeweils 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 und 0,1g betrug. Da diese Versuchsreihe bei pH-Werten mit einem größeren Abstand vom IEP ablaufen sollte, andererseits eine Veränderung im Bindungsverhalten der Faktoren II, VII und X erst unterhalb eines pH's von 6,2 auftraten (s.S. 64), wurde der pH aller Pufferlösungen und des mit NaCl im Verhältnis 1 : 1 verdünnten Plasmas auf pH 7,0 eingestellt. Da die Verwendung einer 0,17 M NaCl-Lösung zur Herstellung der Plasma-Verdünnung sowie der Natrium-Zitrat/NaCl-Pufferlösungen keine wesentlichen Vorteile gezeigt hatte, wurde eine 0,15 M NaCl-Lösung zum Ansetzen aller Lösungen verwendet. Damit setzte sich der Quellpuffer für die DEAE-Cellulose aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 9 Teilen 0,15 M NaCl, pH 7,0 zusammen.

Der Versuchsablauf glich dem Versuchsablauf der oben beschriebenen Versuche: Nachdem die Säule und die Plasmaverdünnung in der schon beschriebenen Weise vorbereitet worden waren, wurde die Plasmaverdünnung auf die Säule aufgetragen. Nach dem vollständigen Eindringen der Plasmaverdünnung in die Säule wurde mit einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 19 Teilen

Abb.7

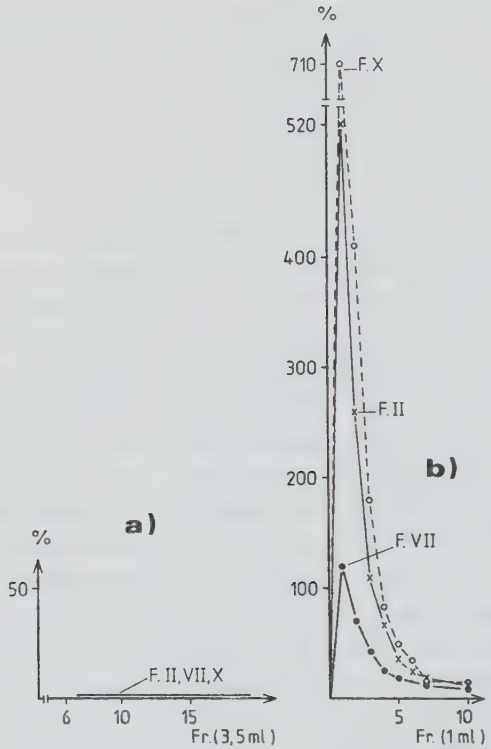


Abb. 7 - 9: Modifikationen des Verfahrens von LECHNER und DEUTSCH:
S e n k u n g d e s p H - W e r t e s

25ml humanes Zitratplasma wurden mit 25ml 0,17 M NaCl-Lösung verdünnt. Der pH-Wert des verdünnten Plasmas wurde ausgehend von pH 7,4 in jedem Versuch um jeweils 0,2 Einheiten gesenkt; nach der pH-Einstellung wurde die Verdünnung an 1g DEAE-Cellulose chromatographiert, die mit einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 9 Teilen NaCl äquilibriert war. Die nicht gebundenen Proteine wurden mit einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 19 Teilen 0,17 M NaCl entfernt. Die beiden Pufferlösungen hatten jeweils den pH der Plasmaverdünnung. Danach wurden die gebundenen Gerinnungsfaktoren mit einer Pufferlösung aus 0,02 M Natrium-Phosphat und 1,0 M NaCl, pH 7,0 eluiert. Abb. 7 - 9 zeigen typische Beispiele dieser Versuchsreihe, wobei Abb. 7

Abb.8

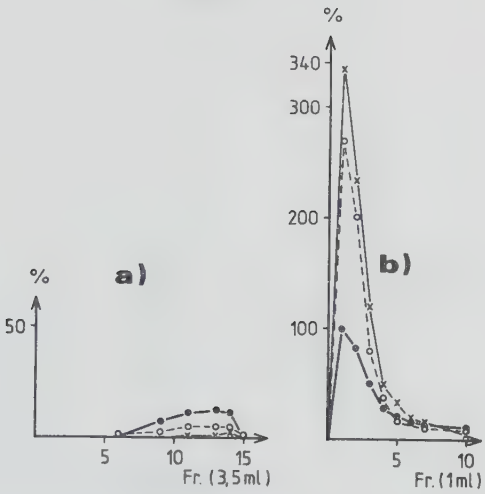
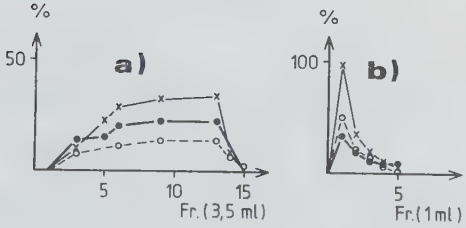


Abb.9



den Versuch bei pH 6,4, Abb. 8 den bei pH 5,8 und Abb. 9 den bei pH 5,2 zeigt.

Teil a) zeigt jeweils die Chromatographie der Plasmaverdünnungen,
Teil b) die Elution der an den Austauscher gebundenen Faktoren.
Wegen der unterschiedlichen Aktivitätsbereiche wurde bei a) ein größerer Maßstab gewählt.

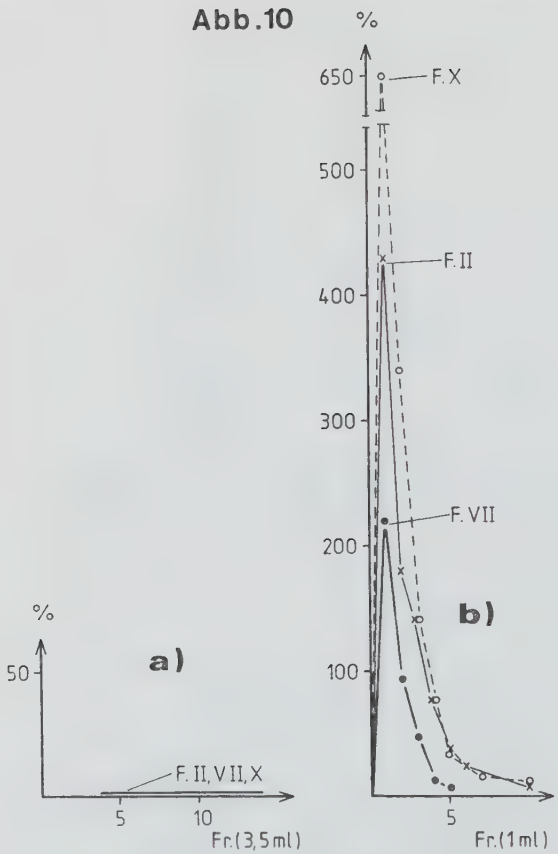


Abb. 10 - 12: Modifikationen des Verfahrens von LECHNER und DEUTSCH: Verminderung der Ionenaustauschermenge

25ml humanes Zitratplasma wurde mit 25ml 0,15 M NaCl verdünnt, der pH auf 7,0 eingestellt; die Verdünnung wurde an verschiedenen Mengen DEAE-Cellulose, die mit einem Puffer aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 9 Teilen NaCl, pH 7,0 äquilibriert waren, chromatographiert, wobei in jedem Versuch eine geringere Austauschermenge als im jeweils vorhergehenden Versuch verwendet wurde. Die nicht an den Austauscher adsorbierten Proteine wurden mit einem Puffer aus

Abb.11

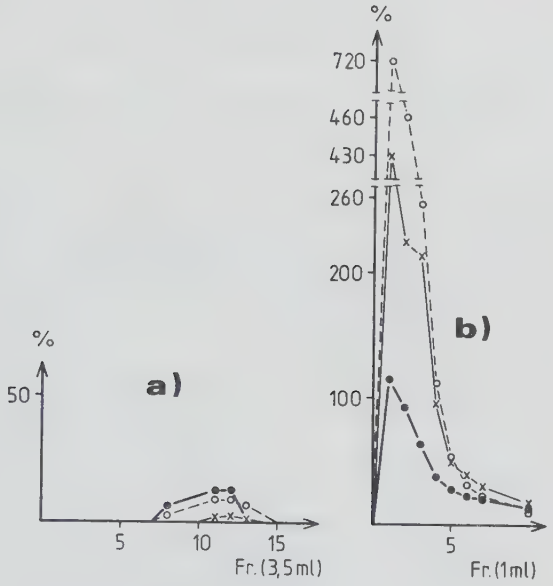
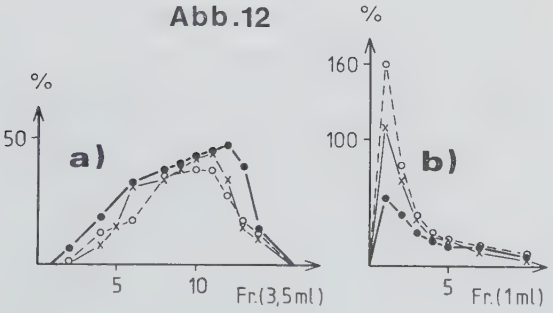


Abb.12



1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 19 Teilen 0,15 M NaCl entfernt; anschließend erfolgte die Elution der gebundenen Gerinnungsfaktoren mit einem Puffer aus 0,02 M Natrium-Phosphat, 1,0 M NaCl, pH 7,0.

Abb. 10 zeigt den Versuch mit einer Austauschermenge von 0,8g,

Abb. 11 mit 0,4g und Abb. 12 mit 0,1g.

Teil a) der Abbildungen zeigt die Chromatographie der Plasmaverdünnungen,

Teil b) die Elution der gebundenen Gerinnungsfaktoren.

In a) wurde ein größerer Maßstab als in b) gewählt.

0,15 M NaCl pH 7,0, solange nachgewaschen, bis kein Protein mehr eluiert wurde. Danach wurden die gebundenen Gerinnungsfaktoren mit einer Pufferlösung aus 0,02 M Natrium-Phosphat und 1,0 M NaCl, pH 7,0, eluiert.

Zwei weitere Versuche mit 50ml Plasmaverdünnung und 0,4 bzw. 0,2g DEAE-Cellulose wurden bei pH 5,8 in derselben Versuchsanordnung durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 10 - 12 und 13 dargestellt. Bei einer Ionenaustauschermenge von 0,4g und weniger wurden die Faktoren II, VII und X bereits im Vorlauf in zunehmender Konzentration gefunden; in gleichem Maße nahm die Konzentration dieser Faktoren im Eluat ab. Auch hier kommt es zu keiner wesentlichen Veränderung im Verhältnis der Faktoren II/VII und X/VII; durch eine Verminderung der Kapazität der Säule läßt sich also keine Trennung des Faktors VII von den Faktoren II und X erreichen. Eine zusätzliche Senkung des pH konnte das Versuchsergebnis ebenfalls nicht verbessern (s. Abb. 13).

Nachdem mit den Modifikationen der ursprünglichen Methode eine weitergehende Abtrennung des Faktors VII von den Faktoren II und X nicht erreicht werden konnte, wurden einige Versuche mit DEAE-Sephadex als Ionenaustauscher durchgeführt,um einen möglichen, wenn auch unwahrscheinlichen Einfluß der Ionenaustauschermatrix auf das Bindungsverhalten der Faktoren II, VII, X zu prüfen.

Die Versuche mit DEAE-Sephadex wurden bei einem pH von 5,8 durchgeführt, um eventuelle Unterschiede im Bindungsverhalten in der Nähe des isoelektrischen Punktes besser erkennen zu können. Die Versuchsanordnung entsprach den Experimenten mit DEAE-Cellulose. Es wurde lediglich eine größere Ionenaustauscher- und Plasmamenge verwendet: 35ml Zitratplasma wurden mit 35 ml 0,15 M NaCl verdünnt, der pH dieser Verdünnung auf 5,8 eingestellt. Die Verdünnung wurde an 1,5g DEAE-Sephadex A 25 chromatographiert, das mit einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 9 Teilen 0,15 M NaCl, pH 5,8 äquilibriert war. Zur Entfernung der nicht gebundenen Proteine wurde nach dem Eindringen der Plasmaverdünnung in die Säule mit einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 19 Teilen 0,15 M NaCl, pH 5,8, nachgewaschen. Die Elution der gebundenen Gerinnungsfaktoren erfolgte mit 0,02 M Natrium-Phosphat, 1,0 M NaCl pH 5,8.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 14 gezeigt. Ein wesentlicher Unterschied im Elutionsprofil gegenüber den Versuchen mit DEAE-Cellulose (z.B. Abb. 8b) ist nicht festzustellen: eine deutliche Verminderung des Verhältnisses der Aktivität der Faktoren II/VII bzw. X/VII konnte durch die Verwendung

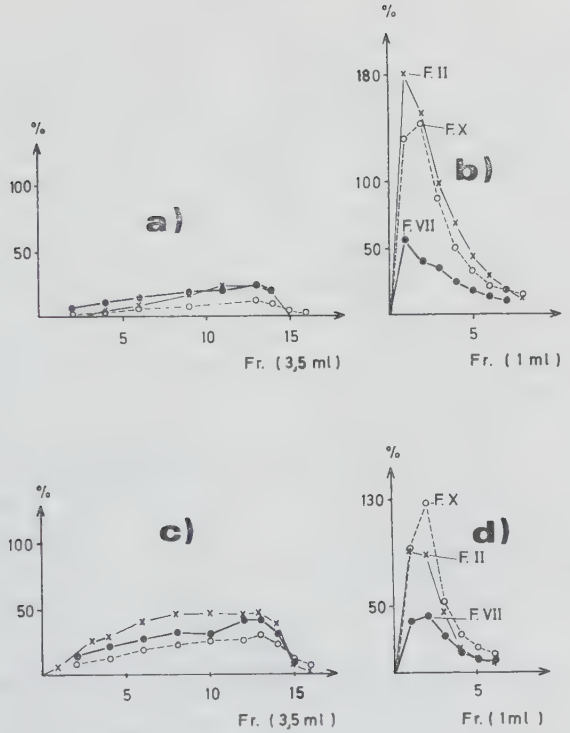


Abb. 13: Modifikationen des Verfahrens von LECHNER und DEUTSCH:
V e r m i n d e r u n g d e r A u s t a u s c h e r m e n g e
b e i pH 5,8

25ml Zitratplasma wurden mit 25ml 0,15 M NaCl verdünnt; der pH wurde auf 5,8 eingestellt. Die Plasmaverdünnung wurde an 0,4g bzw. 0,2g DEAE-Cellulose chromatographiert, die mit einem Puffer aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 9 Teilen 0,15 M NaCl äquilibriert war. Nach dem Eindringen der Plasmaverdünnung wurden die nicht gebundenen Proteine mit einem Puffer aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 19 Teilen 0,15 M NaCl, pH 5,8 entfernt. Anschließend wurden die gebundenen Gerinnungsfaktoren mit einer Pufferlösung aus 0,02 M Natrium-Phosphat, 1,0 M NaCl, pH 7,0 eluiert.

Die Abb. a) und b) zeigen den Versuch mit 0,4g DEAE-Cellulose,
die Abb. c) und d) den Versuch mit 0,2g DEAE-Cellulose.
Abb. a) und c) zeigen die Aktivitäten im Vorlauf,
Abb. b) und d) die Elution der gebundenen Faktoren.

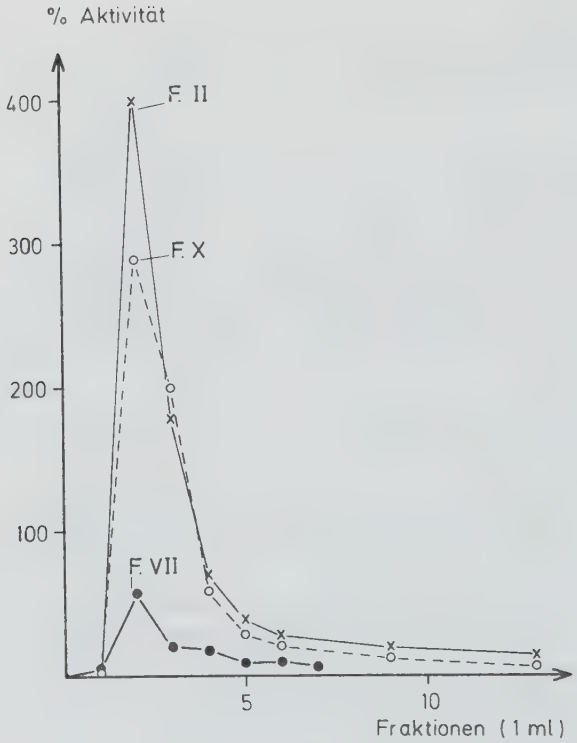


Abb. 14: Modifikation des Verfahrens von LECHNER und DEUTSCH: Chromatographie von Humanplasma an DEAE-Sephadex bei pH 5,8

35ml Zitratplasma, verdünnt mit 35ml 0,15 M NaCl, wurden bei einem pH von 5,8 an 1,5g DEAE-Sephadex chromatographiert, das mit einem Puffer aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 9 Teilen 0,15 M NaCl äquilibriert war. Die nicht an den Austauscher gebundenen Proteine wurden mit einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 19 Teilen NaCl, pH 5,8, entfernt. Die Elution erfolgte mit einem Puffer aus 0,02 M Natrium-Phosphat, 1,0 M NaCl bei einem pH von 7,0.

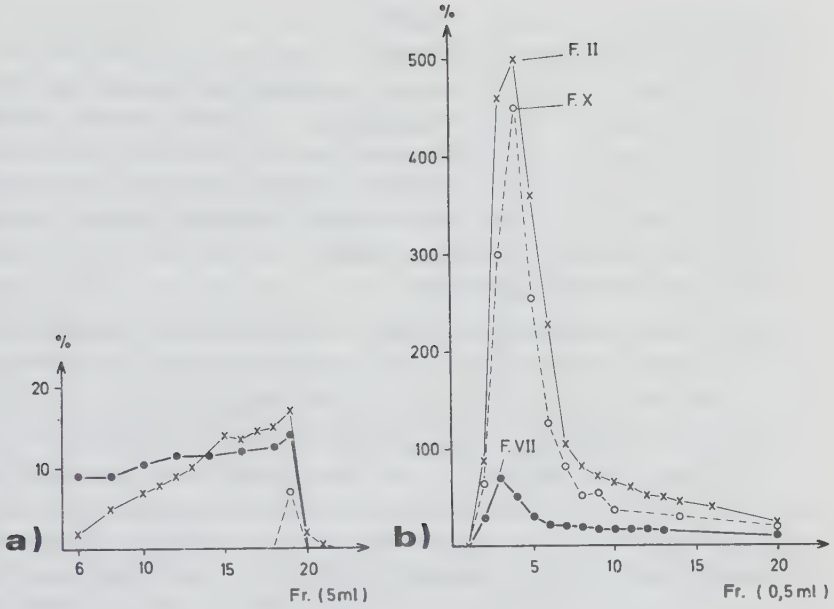


Abb. 15: Modifikationen des Verfahrens von LECHNER und DEUTSCH: Chromatographie von Humanplasma an DEAE-Sephadex bei pH 5,8 und Verminderung der Ionenaustauschermenge

60ml humanes Zitratplasma wurden mit 60ml 0,15 M NaCl-Lösung verdünnt, diese Plasmaverdünnung bei einem pH von 5,8 an 1g DEAE-Sephadex chromatographiert, das mit einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 9 Teilen 0,15 M NaCl äquilibriert war. Die nicht gebundenen Proteine wurden mit einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 19 Teilen 0,15 M NaCl, pH 5,8, entfernt.

Teil a) der Abbildung zeigt die Chromatographie der Plasmaverdünnung

Teil b) zeigt die Elution der gebundenen Gerinnungsfaktoren mit einer Pufferlösung aus 0,02 M Natriumphosphat, 1,0 M NaCl, pH 7,0.

von DEAE-Sephadex nicht erzielt werden.

Zwei weitere Versuche, die der dritten Versuchsreihe der Experimente mit DEAE-Cellulose mit einer Verminderung der Ionenaustauschkapazität der Säule entsprechen, wurden mit 3g DEAE-Sephadex und 100ml Plasmaverdünnung sowie mit 1g DEAE-Sephadex und 120ml Plasmaverdünnung in gleicher Weise durchgeführt. Da das DEAE-Sephadex A 25 eine geringere ausnutzbare Kapazität für die zu trennenden Gerinnungsfaktoren als die DEAE-Cellulose hat, erschien eine Erhöhung der Plasmamenge aus technischen Gründen günstiger als eine weitere Verminderung der Ionenaustauschermenge.

Abb. 15 zeigt das Ergebnis des letzten Versuchs mit 1g DEAE-Sephadex. Eine Verminderung der Ionenaustauschermenge bzw. in diesem Versuch eine Erhöhung der Plasmamenge führt auch bei der Verwendung von DEAE-Sephadex nicht zu einer wesentlich besseren Abtrennung des Faktors VII von den Faktoren II und X.

Da die Verminderung der Kapazität der Säule auf die Chromatographie einen ähnlichen Effekt hat wie die Erhöhung der Ionenstärke (Konkurrenz der Anionen um die Bindungsstellen), und da bei den Versuchen mit DEAE-Cellulose eine Erhöhung der Ionenstärke keinen wesentlichen Effekt auf das Ergebnis der Chromatographie hatte, wurde hier auf eine weitere Versuchsreihe mit einer Erhöhung der Ionenstärke verzichtet.

5.2.2 Versuche mit Schafsplasma

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß humaner Faktor VII von den Faktoren II und X durch Chromatographie an DEAE-Ionenaustauschern in Anlehnung an das Verfahren von LECHNER und DEUTSCH nicht vollständig abgetrennt werden konnte, wurde versucht, mit gleicher oder ähnlicher Versuchsanordnung eine Trennung der Gerinnungsfaktoren II, VII und X anderer Spezies zu erreichen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in diesem und den darauffolgenden Abschnitten dargestellt. Bei den Versuchen mit Schafsplasma zeigte sich, daß für eine wirksame Antikoagulation des Blutes 110ml 3,8% Natrium-Zitrat pro Liter Zitratblut nicht ausreichten. Erst durch eine Erhöhung der Menge der Natrium-Zitratlösung auf 220ml pro Liter konnte die Gerinnselbildung verhindert werden, obwohl die Kalziumkonzentration im Schafsplasma nicht höher liegt als in menschlichem Plasma (57).

Es sollten zwei Versuche mit je 5g DEAE-Cellulose bzw. DEAE-Sephadex und 200ml 1 : 1 mit 0,15 M NaCl verdünnten Schafplasmas durchgeführt werden. Die Versuchsanordnung entsprach der Anordnung der Versuche mit Humanplasma, wobei zur Entfernung der nicht gebundenen Proteine von der Säule eine Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 19 Teilen 0,15 M NaCl, pH 5,8, verwendet wurde. Die Elution erfolgte mit einer Lösung aus 0,02 M Natrium-Phosphat, 1,0 M NaCl, pH 7,0. Da sich in der Plasmaverdünnung während der Chromatographie Protein-Präzipitate bildeten, konnten in beiden Versuchen nur jeweils 170ml Plasmaverdünnung in die Säule eindringen.

Im Eluat war die Aktivität des Prothrombins gegenüber der Aktivität der Faktoren VII und X stark vermindert.

Als Ursache dieser niedrigen Prothrombin-Aktivität im Eluat ist nicht unbedingt ein Trenneffekt durch die Chromatographie anzunehmen. Sie könnte auch die Folge einer Aktivierung des Gerinnungssystems sein. Für diese Deutung spricht die Bildung der Proteinpräzipitate, bei denen es sich um Fibringerinnsel gehandelt haben könnte sowie die niedrige Prothrombin-Aktivität im Ausgangsplasma (s. Tab. 4, S. 84), die möglicherweise ebenfalls trotz der erhöhten Zitratmenge auf eine Aktivierung des Gerinnungssystems zurückzuführen sein könnte.

5.2.3 Versuche mit Pferdeplasma

Von den Versuchen mit Pferdeplasma soll in diesem Abschnitt nur einer geschildert werden, dessen Resultate das Bindungsverhalten der Gerinnungsfaktoren II, VII und X aus Pferdeplasma charakterisieren können.

5g DEAE-Sephadex wurden nach dem Quellen in eine Glassäule gefüllt; zum Äquilibrieren des DEAE-Sephadex wurde eine Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 9 Teilen 0,15 M NaCl, pH 7,5, benutzt. Die letzten 80ml dieser Pufferlösung enthielten 6 USP-E Heparin/ml (Gründe s.u.).

Das Pferdezitratplasma wurde in üblicher Weise gewonnen. Da sich in einem der Vorversuche bei der Chromatographie soviel Thrombin gebildet hatte, daß anschließend die Bestimmung der Gerinnungsaktivität in den Eluaten nicht mehr möglich war, wurde dem Plasma Heparin bis zu einer Endkonzentration von 25 USP-E Heparin/ml Plasma zugegeben; die Pufferlösung zum Äquilibrieren der Säule sowie die Lösung zum Entfernen der nicht gebundenen Proteine enthielten eben-

falls Heparin.

200ml Plasma wurden auf die Säule aufgetragen. Nach dem Eindringen des Plasmas wurden die nicht gebundenen Proteine mit einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 19 Teilen 0,15 M NaCl, pH 7,5, entfernt. Diese Lösung enthielt 0,25 USP-E Heparin/ml.

Die Elution der gebundenen Gerinnungsfaktoren erfolgte stufenweise mit drei Pufferlösungen, die jeweils 0,02 M Tris sowie 0,2 M, 0,5 M und 1,5 M NaCl enthielten. Der pH dieser Pufferlösungen war auf 7,5 eingestellt.

Trotz der Zugabe des Heparins konnte Thrombin in den Eluaten nachgewiesen werden; die Thrombinaktivität war jedoch soweit vermindert, daß eine Bestimmung der Aktivität von Gerinnungsfaktoren möglich war. Um dabei den Einfluß des möglicherweise in den Fraktionen enthaltenen Heparins auf die Gerinnungsbestimmungen zu vermindern, wurde den Fraktionen, wenn bei der ersten Bestimmung keine Gerinnungsaktivität nachweisbar war, Protaminchlorid in der Endkonzentration von ~ 3 E/ml zugegeben.

Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren II, VII und X konnte nur in den Fraktionen der zweiten Elutionsstufe mit 0,02 M Tris und 0,5 M NaCl nachgewiesen werden. Eine Trennung der Faktoren II, VII und X wurde nicht beobachtet.

5.2.4 Versuche mit Rinderplasma

In zwei Vorversuchen, bei denen die Gerinnungsfaktoren II, VII und X aus Rinderzitratplasma in ähnlicher Weise wie bei den vorhergehenden Versuchen an DEAE-Cellulose- bzw. DEAE-Sephadex-Säulen adsorbiert wurden, ließen sich Plasmafraktionen herstellen, in denen die Aktivität des Prothrombins gegenüber der Aktivität der Faktoren VII und X weitgehend vermindert war. Diese Ergebnisse ließen die Herstellung größerer Mengen dieser Plasmafraktion sinnvoll erscheinen, wobei versucht werden sollte, durch Modifikation der Versuchsanordnung die Aktivität des Prothrombins in der Plasmafraktion weiter zu vermindern. Als Ionenaustauscher wurde DEAE-Cellulose verwendet, weil damit, wie sich in den oben erwähnten Vorversuchen herausgestellt hatte, eine höhere Aktivität der Faktoren VII und X in den Plasmafraktionen zu erreichen war. Die Bindung der Gerinnungsfaktoren an den Ionenaustauscher erfolgte in Batch-Verfahren, um bei der relativ großen Menge Rinderplasma eine Beschleunigung des Versuchsablaufs zu erreichen.

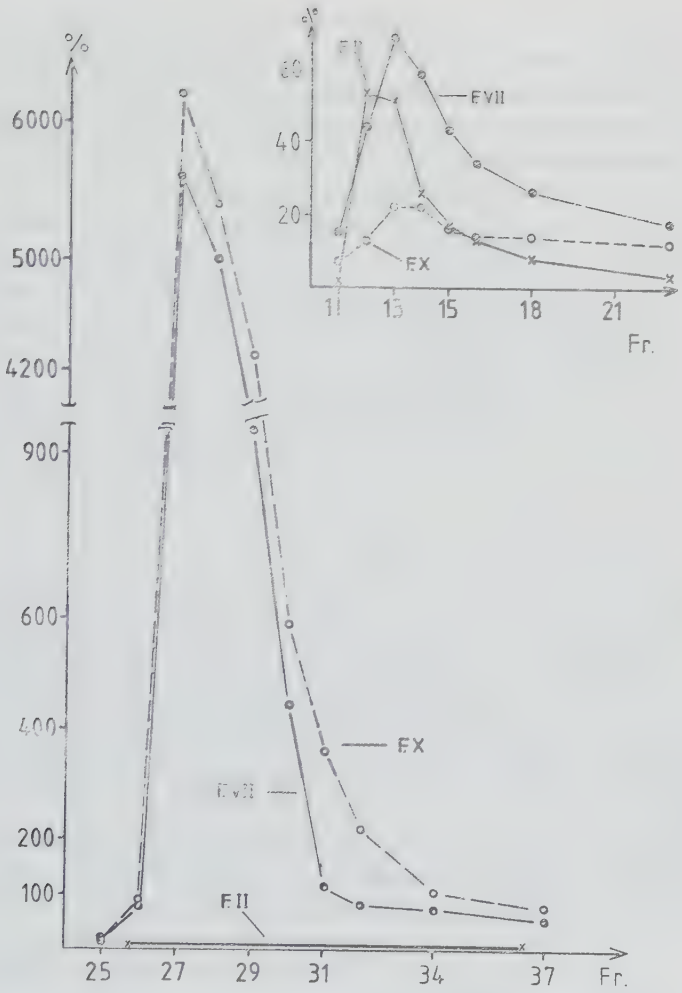


Abb. 16: Stufenweise Elution der Faktoren II, VII und X aus 500ml Rinderzitratplasma von einer Säule aus 20g DEAE-Cellulose mit folgenden Elutionslösungen:

kleine Abb.: 0,02 M Tris, 0,2 M NaCl, pH 7,6
große Abb.: 0,02 M Tris, 1,0 M NaCl, pH 7,6
Fraktionsvolumen: 4ml

Der Versuchsablauf sah folgendermaßen aus: Zum Quellen von 20g DEAE-Cellulose wurden 1000ml einer Pufferlösung aus 1 Teil Natrium-Zitrat und 9 Teilen 0,15 M NaCl, pH 7,5 verwendet. Nach dem Quellen wurde die überstehende Lösung dekantiert und 500ml Rinderzitratplasma zu dem Ionenaustauscher gegeben. Das Gemisch wurde zur Adsorption der Gerinnungsfaktoren 20 min. mit Hilfe eines Magnetrührers bei Raumtemperatur gerührt. Danach blieb das Gemisch einige Zeit stehen, bis sich die Cellulose abgesetzt hatte. Das überstehende Plasma wurde dekantiert. Die DEAE-Cellulose wurde in soviel Quellpuffer suspendiert, daß die Suspension in eine Glassäule gefüllt werden konnte. Zur Entfernung der nicht dekantierten Plasmareste und der nicht gebundenen Proteine wurde mit einer Pufferlösung gleicher Zusammensetzung solange nachgespült, bis kein Protein mehr in der Spülflüssigkeit nachweisbar war. Anschließend wurden die Proteine stufenweise eluiert. Dazu wurden zwei Pufferlösungen benutzt: 1) Tris 0,02 M, NaCl 0,2 M; 2) Tris 0,02 M, NaCl 1,0 M. Der pH beider Lösungen betrug 7,6. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 4ml aufgefangen und die darin enthaltenen Gerinnungsaktivitäten bestimmt.

Das Ergebnis ist in Abb. 16 dargestellt. Bei der Elution mit 0,2 M NaCl erschienen die Faktoren II, VII, X in einer recht geringen Aktivität von 20% - 60% (Fraktion 11-22). Bei der Elution mit 1,0 M NaCl (Fraktion 26-30) erschien die Aktivität der Faktoren VII und X, die noch an den Austauscher gebunden waren, in einem relativ scharf begrenzten Peak in sehr hoher Konzentration bis zu 6000%. Faktor II war auch in den Fraktionen mit der höchsten Aktivität nicht mehr enthalten. Faktor V konnte in keinem der Eluate nachgewiesen werden.

Somit war es in der oben beschriebenen einfachen Versuchsanordnung gelungen, eine vollständige Abtrennung des Prothrombins von den Faktoren VII und X zu erreichen.

5.2.5 Versuche mit Schweineplasma

Zunächst wurden zwei Versuche durchgeführt, in denen die Gerinnungsfaktoren aus jeweils 150ml mit 0,15 M NaCl verdünnt[illegible]ezitratplasma an 5g DEAE-Cellulose bzw. 5g DEAE-Sephadex adsorbiert [illegible]ie Versuche wurden von Anfang an mit einer größeren Plasma- sowie Ionenaustauschermenge durchgeführt, weil sich die Handhabung dieser Ionenaustauschermenge und der größeren Säule

(15mm) als technisch einfacher herausgestellt hatte als die Handhabung der kleineren Säule und Austauschermenge.
Um Adsorptionsunterschiede der Gerinnungsfaktoren aus Schweineplasma deutlicher werden zu lassen, wurde die Adsorption der Gerinnungsfaktoren aus dem Zitratplasma bei einem pH in der Nähe des vermuteten IEP der Gerinnungsfaktoren, nämlich bei pH 5,8 bzw. 6,4 (s.u.), durchgeführt.

Zum Quellen der 5g DEAE-Cellulose bzw. des DEAE-Sephadex wurde eine Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 9 Teilen 0,15 M NaCl, verwendet. Der pH der Lösung betrug in dem DEAE-Sephadex-Versuch 5,8, in dem DEAE-Cellulose-Versuch 6,4 (s.u.). Nach dem Quellen wurden die im Puffer suspendierten Ionenaustauscher in die Glassäulen gefüllt und mit dem gleichen Puffer äquilibriert.

Die Versuche wurden mit jeweils 150ml Schweinezitratplasma durchgeführt; um die Versuchsdauer zu vermindern, wurde das Plasma nicht 1 : 1 mit 150ml 0,15 M NaCl-Lösung, sondern mit 100ml verdünnt. Bei dem Versuch mit DEAE-Sephadex wurde anschließend der pH der Plasmaverdünnung mit 0,1 M HCl auf 5,8 eingestellt. Bei dem DEAE-Cellulose-Versuch konnte der pH nicht auf diesen niedrigen Wert eingestellt werden. Die pH-Erniedrigung führte nämlich zu einer solchen Viskositätserhöhung des Schweineplasmas, daß bei der Passage der Plasmaverdünnung durch die Säule nur unter Verwendung des DEAE-Sephadex, das aufgrund der perlförmigen Struktur der Granula eine besonders gute Strömungscharakteristik aufweist (61), eine praktikable Durchflußgeschwindigkeit erreicht werden konnte, bei der Verwendung der DEAE-Cellulose dagegen nicht mehr. Bei dem DEAE-Cellulose-Versuch wurde der pH der Plasmaverdünnung deshalb auf 6,4 eingestellt. Nach der pH-Einstellung wurden die Plasmaverdünnungen auf die Säulen aufgetragen und nach dem vollständigen Eindringen der Verdünnungen die Säulen von den nicht gebundenen Proteinen mit einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 9 Teilen 0,15 M NaCl, pH 5,8, freigewaschen. Die Elution der gebundenen Gerinnungsfaktoren erfolgte mit einer Pufferlösung aus 0,02 M Natrium-Phosphat, 1,0 M NaCl. Der pH dieser Lösung betrug 7,0.

Auffallend war in beiden Versuchen die im Gegensatz zu den Faktoren II und VII starke Adsorption des Faktors X an beide Ionenaustauscher. Sie war zum einen daran erkennbar, daß im Vorlauf kein Faktor X nachgewiesen werden konnte, während die Faktoren II und V im Vorlauf erschienen; der Faktor VII konnte wegen des Fehlens von Faktor X im Vorlauf nicht mit der Methode von KOLLER und Mitarb. (150) nachgewiesen werden. Zum anderen ließ sich dieses Adsorptionsverhalten am Elutionsprofil (Abb. 17 a und b) erkennen. Der Faktor X

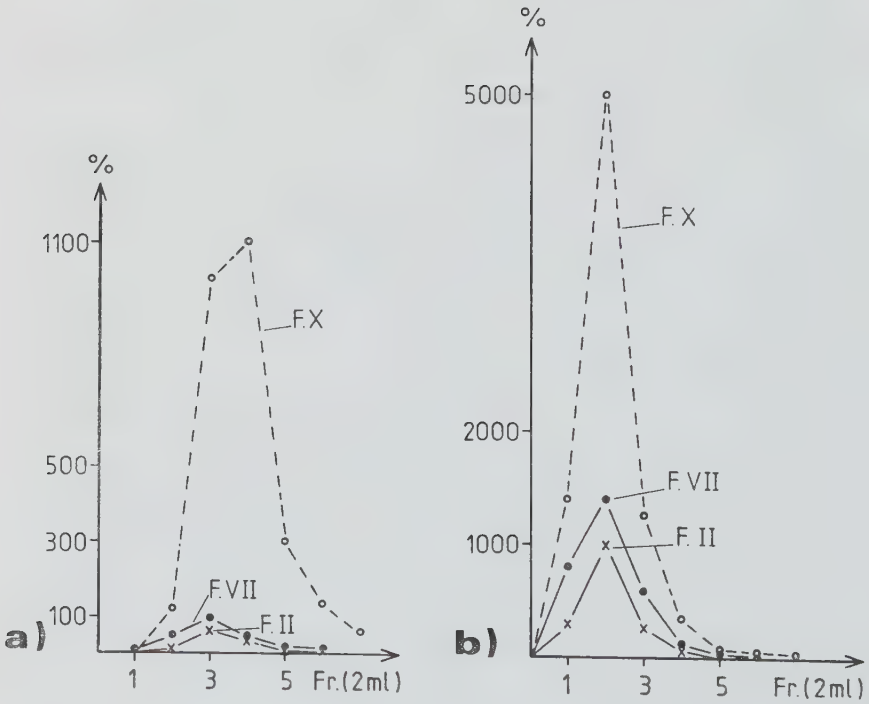


Abb. 17: Elution der aus 150ml Schweinezitratplasma adsorbierten Faktoren II, VII und X von einer Säule aus
a) 5g DEAE-Sephadex
b) 5g DEAE-Cellulose
mit 0,02 M Natrium-Phosphat, 1,0 M NaCl bei einem pH von 7,0.

konnte in beiden Eluaten in sehr viel höherer Aktivität als die Faktoren II und VII nachgewiesen werden. Faktor V (nicht eingezeichnet) konnte nicht nachgewiesen werden. Wie bei den Versuchen mit Rinderplasma wies das Eluat der DEAE-Cellulose-Säule eine höhere Aktivität der Faktoren II, VII und X auf als das Eluat von der DEAE-Sephadex-Säule. Weiter fällt auf, daß die Aktivität der Faktoren II und VII in dem Eluat der DEAE-Sephadex-Säule (Abb. 17a) gegenüber der Aktivität des Faktors X relativ stärker vermindert ist als im Eluat der DEAE-Cellulose-Säule.

Die Fraktionen des Eluates von der DEAE-Sephadex-Säule mit der höchsten Faktor X-Aktivität wurden gepoolt und gegen eine Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 4 Teilen 0,15 M NaCl, pH 7,5, bei 4°C dialysiert. Die Bestimmung der Gerinnungsfaktoren des Pools vor und nach der Dialyse ergab folgende Aktivitäten:

	II	VII	X
vor Dialyse	16%	22%	500%
nach Dialyse	22%	70%	500%

Um zu prüfen, ob der Anstieg der Faktor VII-Aktivität nach Dialyse möglicherweise durch eine Aktivierung infolge der starken Veränderungen der Ionenstärke während der Dialyse bei weitgehendem Fehlen von Schutzkolloiden bedingt sein könnte, wurde dieser Versuch wiederholt, wobei den Fraktionen des Eluats Rinderalbumin in der Endkonzentration von 7% nach der Chromatographie zugegeben wurde. Anschließend wurden wieder die Fraktionen mit der höchsten Faktor X-Aktivität gepoolt und dialysiert. Die Bestimmung der Gerinnungsaktivitäten zeigte folgende Ergebnisse (in %):

	II	VII	X
vor Dialyse	8%	19%	450%
nach Dialyse	9%	40%	400%

Auf diese einfache Weise läßt sich somit der Anstieg der Faktor VII-Aktivität nach Dialyse nicht wesentlich vermindern. Da das Volumen des Fraktionenpools

vor und nach Dialyse gleich war, sind diese Aktivitätsänderungen auch nicht durch einen Konzentrationseffekt zu erklären. Eine plausible Erklärung wäre eine Verlängerung der Reaktionszeit durch die hohe Ionenstärke in dem Fraktionspool, die eine zu niedrige Aktivitätsmessung vor der Dialyse zur Folge hat.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob sich die Faktoren II, VII und X aus Schweineplasma durch stufenweise Elution von der Säule trennen ließen. Es stellte sich heraus, daß mit einer 0,26 M NaCl-Lösung der Faktor II weitgehend, die Faktoren VII und X teilweise von der Säule eluiert wurden. Mit einer 0,5 M NaCl-Lösung konnten nur noch die Faktoren VII und X eluiert werden. Eine vollständige Trennung des Faktors X vom Faktor VII wurde nicht erreicht; ebenso konnte das Prothrombin nicht frei von Faktor VII dargestellt werden.

Nachdem sich eine im Vergleich zum Human- und Rinderplasma unterschiedliche Bindungscharakteristik der Gerinnungsfaktoren II, VII und X des Schweineplasmas an DEAE-Ionenaustauscher gezeigt hatte, wurde in einigen Experimenten untersucht, ob das Adsorptionsverhalten dieser Gerinnungsfaktoren an anorganische Adsorbentien ebenfalls von dem der Faktoren anderer Spezies differierte. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im folgenden kurz zusammengefaßt:

1 Die Faktoren II, VII und X können an Kalziumphosphat $Ca_3 (PO_4)_2$ adsorbiert und mit Phosphatpufferlösungen sowie Oxalatlösungen wieder eluiert werden.

2 Die genannten Faktoren können aus Oxalatplasma an $BaSO_4$ adsorbiert und durch Natrium-Zitratlösungen wieder eluiert werden; das Adsorptionsverhalten der Faktoren entspricht damit dem der Faktoren aus Human- und Rinderplasma.

3 Die Faktoren werden bei der Asbestfiltration gleichmäßig adsorbiert, ein Verhalten, welches auch bei der Asbestfiltration von Humanplasma beobachtet werden kann (150).

Damit zeigen die Faktoren II, VII, X aus Schweineplasma keine auf den ersten Blick erkennbaren Unterschiede im Adsorptionsverhalten an anorganische Adsorbentien zu den Faktoren aus Human- und Rinderplasma.

5.2.6 Zusammenfassung der orientierenden Versuche

In den bisherigen Versuchen wurde bei weitgehend gleichem Versuchsaufbau, der in der Adsorption und anschließenden Trennung der Gerinnungsfaktoren durch ein- oder zweistufige Elution bestand, das Bindungsverhalten der Vitamin K-abhängigen Faktoren II, VII und X verschiedener Spezies an DEAE-Ionenaustauscher untersucht. Darüberhinaus wurde für Schweineplasma das Adsorptionsverhalten an Asbest, Bariumsulfat und Kalziumphosphat untersucht.

Um die Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchungen zu erleichtern, wurden die Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren II, VII und X in den Plasmen der untersuchten Spezies sowie in den Plasmafraktionen, die durch Adsorption der Gerinnungsfaktoren an DEAE-Ionenaustauscher und anschließende Elution hergestellt wurden, in Tab. 4 zusammengestellt. Die angegebenen Werte sind Versuchsergebnissen entnommen, die das typische Verhalten der Gerinnungsfaktoren II, VII und X der jeweils untersuchten Spezies unter den gewählten Bedingungen charakterisieren.

In den aus Humanplasma hergestellten Plasmafraktionen zeigte sich eine Aktivitätsminderung des Faktors VII gegenüber den Faktoren II und X, die bei der Bestimmung der Faktor VII-Aktivität mit einer Methode unter Verwendung eines natürlichen Mangelplasmas deutlicher erkennbar war als bei der Bestimmung mit der Methode von KOLLER und Mitarb. (150). Eine weitere Verminderung der Faktor VII-Aktivität durch Modifikation der ursprünglichen Versuchsanordnung konnte nicht erreicht werden.

Bei den Versuchen mit Schafsplasma konnte die schon im Plasma relativ niedrige Prothrombinaktivität durch die Chromatographie weiter vermindert werden. Im Verhältnis zu der hohen Faktor X-Aktivität war die Prothrombinaktivität in den Plasmafraktionen sehr gering.

Eine Trennung der Faktoren II, VII und X aus Pferdeplasma konnte mit der angegebenen Methode nicht erreicht werden.

Aus Rinderplasma konnte dagegen durch Adsorption der Gerinnungsfaktoren an DEAE-Cellulose und anschließende zweistufige Elution eine Plasmafraktion hergestellt werden, welche durch eine hohe Aktivität der Faktoren VII und X sowie ein völliges Fehlen der Prothrombinaktivität gekennzeichnet ist.

Aus dem Schweineplasma konnte der Faktor X weitgehend an die DEAE-Ionenaustauschersäulen adsorbiert werden; dies geht aus dem Fehlen einer meßbaren

	F.II	F.VII (natürl. Mangel-plasma)	F.VII (nach KOLLER)	F.X
Humanplasma:				
Plasma	100%	100%	100%	100%
Eluat von DEAE-Cellulose	98%	6%	36%	88%
Eluat von DEAE-Sephadex	210%		66%	120%
Schafsplasma:				
Plasma	16%*		68%	100%
Eluat von DEAE-Cellulose	3%		400%	3000%
Pferdeplasma:				
Plasma	100%		300%	100%
Eluat von DEAE-Sephadex	535%		600%	520%
Rinderplasma:				
Plasma	40%		100%	100%
Eluat von DEAE-Cellulose				
mit 0,2 M NaCl	30%		40%	20%
mit 1,0 M NaCl	0%		2300%	3000%
Schweineplasma				
Plasma	70%		190%	110%
Eluat von DEAE-Cellulose	320%		600%	1600%
Eluat von DEAE-Sephadex	16%		22%	500%

Tabelle 4: Überblick über die Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, VII und X in den Plasmen der untersuchten Spezies sowie in den durch Ionenaustauscherchromatographie unter den jeweils optimalen Elutionsbedingungen hergestellten Plasmafraktionen anhand typischer Versuchsergebnisse.

*Der niedrige Prothrombinwert im Schafsplasma ist möglicherweise durch eine Aktivierung des Gerinnungssystems bedingt.

Faktor X-Aktivität im Plasmavorlauf hervor. Faktor II und offensichtlich auch Faktor VII wurden nur in geringem Maße an den Austauscher gebunden. Fibrinogen und Faktor V wurden wie bei den Versuchen mit Human-, Schafs- und Rinderplasma, nicht adsorbiert. Dieses Adsorptionsverhalten spiegelt sich auch in der Relation der Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren in den Plasmafraktionen wieder, die durch Elution der gebundenen Proteine von den Ionenaustauschern gewonnen wurden: Die Aktivität der Faktoren II und VII war gegenüber der Aktivität des Faktors X stark vermindert. Der Trenneffekt war bei der Verwendung von DEAE-Sephadex wesentlich stärker als bei der Verwendung von DEAE-Cellulose.

Bei den Versuchen mit Rinder- und Schweineplasma konnte also jeweils einer der drei Faktoren II, VII und X von den anderen abgetrennt werden.

Es ist noch zu erwähnen, daß sich in fast allen Eluaten in wechselndem Ausmaß Thrombinspuren fanden. Besonders hoch war die Thrombinaktivität in den Plasmafraktionen, die aus Pferde- oder Schafsplasma hergestellt wurden. Dies könnte durch eine Aktivierung des Gerinnungssystems infolge einer Gewebsthromboplastinbeimengung bei der Blutentnahme im Strahl (s. Methoden) bedingt sein. Eine weitere Aktivierung während der Chromatographie ist ebenfalls nicht auszuschließen (s. Abschnitt 6).

Aufgrund der in den Voruntersuchungen zur Trennung der Faktoren II, VII und X gewonnenen Erfahrungen wurde nun die Präparation eines Faktor VII-Mangelplasmas unter Verwendung der Plasmafraktionen aus Humanplasma sowie aus Schweineplasma, die Präparation eines Faktor II-Mangelplasmas unter Verwendung der Rinderplasmafraktion und die Präparation eines Faktor X-Mangelplasmas unter Verwendung des Schweineplasmas nach Durchlauf durch die DEAE-Ionenaustauschersäule (Vorlauf) versucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

5.3 Versuche zur Herstellung eines Faktor VII-Mangelplasmas

5.3.1 Versuche unter Verwendung von humanen Plasmafraktionen und $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma

Die Faktor VII-armen Plasmafraktionen, die nach den Methoden von LECHNER und DEUTSCH (161) sowie HEMKER und Mitarb. (123) gewonnen werden konnten, wurden mit humanem oder bovinem $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma zu den spezifischen Faktor VII-Mangelplasmen zusammengesetzt. Ebenso wurden auch die Plasmafraktionen, die hergestellt wurden mit Hilfe von ähnlichen Modifikationen (s. Tab. 6) der ursprünglichen Versuchsanordnung, wie sie auf S. 61 bis S. 73 beschrieben sind, auf ihre Verwendbarkeit zur Herstellung eines Faktor VII-Mangelplasmas überprüft.

Da die Faktor VII-Mangelplasmen, die in diesem Abschnitt beschrieben werden, alle nach derselben Versuchsanordnung hergestellt wurden, können die Präparationsmethoden in einer Versuchsbeschreibung zusammengefaßt werden. Die zur Chromatographie verwendeten Pools aus humanem Plasma wurden 1 + 1 mit 0,15 M NaCl-Lösung verdünnt; der pH der Verdünnung wurde entweder auf 7,5 oder 5,8 eingestellt. Nach dem Quellen der DEAE-Ionenaustauscher (DEAE-Cellulose oder DEAE-Sephadex) in einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 9 Teilen 0,15 M NaCl wurden die Ionenaustauscher in die Glassäulen gefüllt und mit derselben Lösung äquilibriert; der Zitratpuffer hatte in jedem Versuch den pH der Plasmaverdünnung. Sobald die Plasmaverdünnung in die Säule eingedrungen war, wurden die nicht an den Austauscher gebundenen Proteine mit einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 19 Teilen 0,15 M NaCl entfernt. Auch diese Lösung wies den pH der Plasmaverdünnung auf. Die gebundenen Gerinnungsfaktoren wurden mit einer Pufferlösung aus 0,02 M Natrium-Phosphat, 1,0 M NaCl, pH 7,0, eluiert.

Zur Entfernung der hohen NaCl-Konzentration aus dem Eluat wurde in einem Teil der Versuche das Eluat gegen einen Puffer aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 4 Teilen 0,15 M NaCl, pH 7,5, dialysiert, wie es in der Vorschrift von LECHNER und DEUTSCH (161) angegeben ist. In den anderen Versuchen wurde das Eluat an einer Säule aus 20g Sephadex G 25, die mit der eben beschriebenen Pufferlösung äquilibriert war, gelfiltriert. Das dialysierte bzw. gelfiltrierte Eluat wurde mit physiologischer NaCl-Lösung weiter verdünnt, bis die Aktivität der Faktoren II und X 80% - 100% betrug. Diese Verdünnung wurde dann 1 + 1 mit

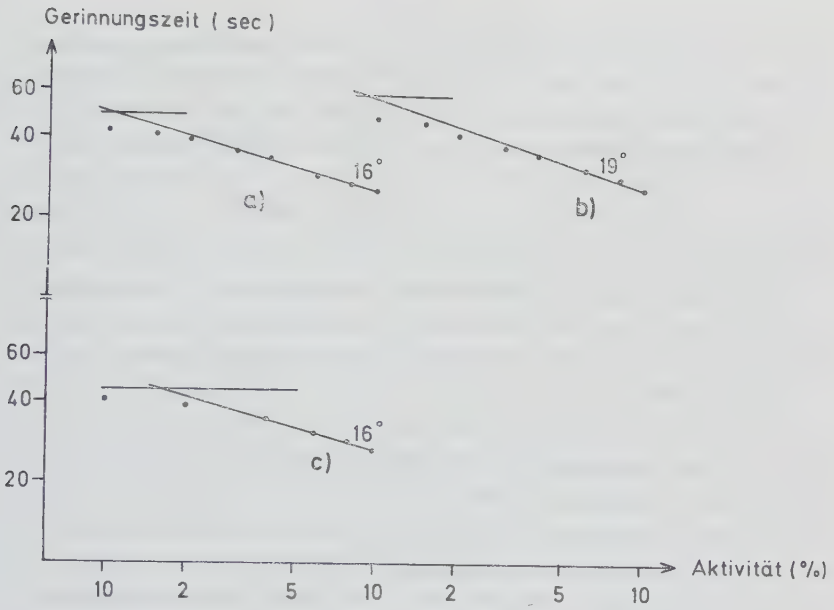


Abb. 18

	F.II	F.V	F.VII (natürl. Mangel-plasma)	F.VII (nach KOLLER)	F.X
Mangelplasma:					
a)	75%	24%		29%	60%
b)	40%	31%		37%	45%
c)	70%	38%	7%	19%	80%

Tab. 5

Abb. 18 und Tab. 5: Bezugskurven und Faktorengehalt von nach der Methode LECHNER und DEUTSCH (161) hergestellten Substratplasmen. Der einzige Unterschied bestand in der Verwendung von humanem $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma als Faktor I/Faktor V-Quelle anstelle von bovinem $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma. Die Substratplasmen sind in Tabelle und Abbildung jeweils mit demselben Buchstaben gekennziechnet.

$BaSO_4$-adsorbiertem Plasma gemischt. Das $BaSO_4$-adsorbierte Plasma wurde entweder wie in der Methode von LECHNER und DEUTSCH aus bovinem Plasma oder aus humanem Plasma hergestellt. Dazu wurden 100mg $BaSO_4$/ml Plasma zu Rinder- bzw. Humanoxalatplasma gegeben. Zur Adsorption der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren wurde das Plasma mit dem $BaSO_4$ 20 min. bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend wurde das $BaSO_4$ durch Zentrifugation vom Plasma getrennt; das Plasma wurde auf die Abwesenheit der Faktoren II, VII und X überprüft.

Im Gemisch dieser beiden Plasmafraktionen waren alle für ein artifizielles Faktor VII-Mangelplasma erforderlichen Faktoren vorhanden: als Quelle für die Faktoren II und X das Eluat, als Quelle für die Faktoren I und V das $BaSO_4$-adsorbierte Plasma (161).

In drei dieser Versuche wurden alle Bedingungen der Arbeit von LECHNER und DEUTSCH bis auf die Verwendung von $BaSC_4$-adsorbiertem Humanplasma anstelle des Rinderplasmas genau eingehalten. Die Zusammensetzung der drei Substratplasmen ist in Tab. 5 angegeben. Der Fibrinogenspiegel in den Mangelplasmen lag jeweils um die Hälfte niedriger als der des humanen $BaSO_4$-adsorbierten Oxalatplasmas. Die Aktivität der für ein spezifisches Faktor VII-Mangelplasma erforderlichen Gerinnungsfaktoren erscheint mit Ausnahme der Aktivität des Faktors V ausreichend hoch. Die Faktor V-Aktivität ist ziemlich niedrig; sie ist auf die Verwendung von humanem $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma zurückzuführen. Von daher erschien zunächst die Verwendung von $BaSO_4$-adsorbiertem Rinderplasma günstiger (s.u.). Die Faktor VII-Aktivitäten erscheinen sehr hoch, wenn sie mit der Methode von KOLLER und Mitarb. gemessen wurde. Im Mangelplasma c) wurde die Faktor VII-Aktivität parallel mit einer Methode unter Verwendung eines natürlichen Mangelplasmas gemssen. Der gefundene Wert von 7% ist sehr viel niedriger als der mit der Methode von KOLLER bestimmte Wert, wie dies auch schon bei der Bestimmung der Faktor VII-Aktivität in den Fraktionen des Eluats von der DEAE-Cellulose-Säule der Fall war (s. Abb. 2). Dennoch erscheint ein Restgehalt von 7% Faktor VII für ein spezifisches Faktor VII-Mangelplasma sehr hoch.

Dementsprechend sind auch die Bezugskurven, die mit diesen drei Mangelplasmen erstellt wurden, nicht in einem sehr großen Aktivitätsbereich, nämlich nur von 100% - 20% linear (Abb. 18); die Empfindlichkeit gegenüber Aktivitätsänderungen des Faktors VII ist also im Aktivitätsbereich unterhalb 20% nicht mehr ausreichend.

Es wurden noch eine Reihe weiterer Substratplasmen unter Anwendung der schon erwähnten Modifikationen der Vorschrift von LECHNER und DEUTSCH hergestellt. Tabelle 6 gibt einen Überblick über Herstellungsweise und den Faktorengehalt dieser Mangelplasmen; die entsprechenden Bezugskurven sind in Abb. 19 dargestellt.

Die Aktivität des Faktors VII erscheint in einigen Mangelplasmen kaum gegenüber der der Faktoren II und X vermindert. Dies dürfte jedoch zum Teil methodisch bedingt sein, da die Faktor VII-Aktivität mit der Methode von KOLLER und Mitarb. (150) bestimmt wurde (s.o.). Dennoch ist die Faktor VII-Restaktivität dieser Mangelplasmen als relativ hoch einzuschätzen, da, wie die Parallelbestimmung der Faktor VII-Aktivität im Mangelplasma c) der Tab. 5 gezeigt hatte, einer Faktor VII-Aktivität von 19%, gemessen mit der Methode von KOLLER und Mitarb., eine Faktor VII-Aktivität von 7%, gemessen mit einer Methode unter Verwendung eines natürlichen Mangelplasmas, entspricht.

Die Bezugskurven der Mangelplasmen, die unter Verwendung von humanem $BaSO_4$-adsorbiertem Oxalatplasma hergestellt wurden und eine niedrige Faktor V-Aktivität aufweisen (Tab. 6, Abb. 19, Mangelplasma 1, 2, 3, 5, 6, 8), zeigen einen größeren Neigungswinkel, d.h. eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen der Faktor VII-Aktivität als die Mangelplasmen, die unter Verwendung von $BaSO_4$-adsorbiertem Rinderoxalatplasma hergestellt wurden und einen hohen Faktor V-Gehalt aufweisen (Tab. 6, Abb. 19, Mangelplasma 4, 7). Die Reaktionszeiten des 100%-Wertes und des Pufferleerwertes dieser Mangelplasmen unterscheiden sich nur um ca. 10 Sekunden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß bei den Faktor VII-Mangelplasmen, die nach der Methode von LECHNER und DEUTSCH sowie nach den beschriebenen Modifikationen dieser Methode (Tab. 6) hergestellt wurden, eine ausreichende Empfindlichkeit nur bis zu einer Aktivität von 20% gewährleistet ist (Abb. 18, 19). Als Ursache dieser geringen Empfindlichkeit ist die hohe Faktor VII-Restaktivität zu diskutieren.

5.3.2 Versuche unter Verwendung von Fraktionen aus Schweineplasma und von asbestfiltriertem Rinderplasma

Durch Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sephadex war es gelungen, Faktor X-Präparate aus Schweineplasma herzustellen, die die bisher niedrigste

Versuchsanordnung:

Äquilibrieren der Säule mit einem Puffer aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat, 9 Teilen 0,15 M NaCl, pH 5,8, pH-Einstellung der humanen Zitratplasmaverdünnung auf pH 5,8, Auftragen der Verdünnung auf die Säule. Entfernen der nicht gebundenen Proteine mit einer Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat, 19 Teilen 0,15 M NaCl, pH 5,8. Elution der gebundenen Gerinnungsfaktoren mit einer Lösung aus 0,02 M Natrium-Phosphat, 1,0 M NaCl, pH 7,0. Dialyse bzw. Gelfiltration gegen eine Pufferlösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 4 Teilen 0,15 M NaCl, pH 7,5. Verdünnung des Eluats auf eine Faktor X-Aktivität von 80%; Mischen des Eluats 1 + 1 mit $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma, das als Faktor I/V-Quelle dient.

Charge	Menge der Plasma-verdünnung	Art und Menge des DEAE-Ionenaustauschers	$BaSO_4$-adsorbiertes Plasma	Austausch der Elektrolyte	Faktorengehalt			
					F.II	F.V	F.VII	F.X
1)	50ml	C 0,2 g	human	D	22%	44%	39%	25%
2)	50ml	C 1,0 g	human	D	36%	43%	24%	40%
3)	100ml	C 2,0 g	human	G	44%	40%	21%	45%
5)	1000ml	C 20,0 g	human	G	50%	11%	20%	45%
6)	1000ml	C 20,0 g	human	G	50%	23%	19%	45%
8)	1000ml	S 20,0 g	human	D	56%	66%	20%	28%
4)	1000ml	C 20,0 g	bovin	G	58%	600%	23%	55%
7)	1000ml	S 20,0 g	bovin	D	43%	330%	14%	45%

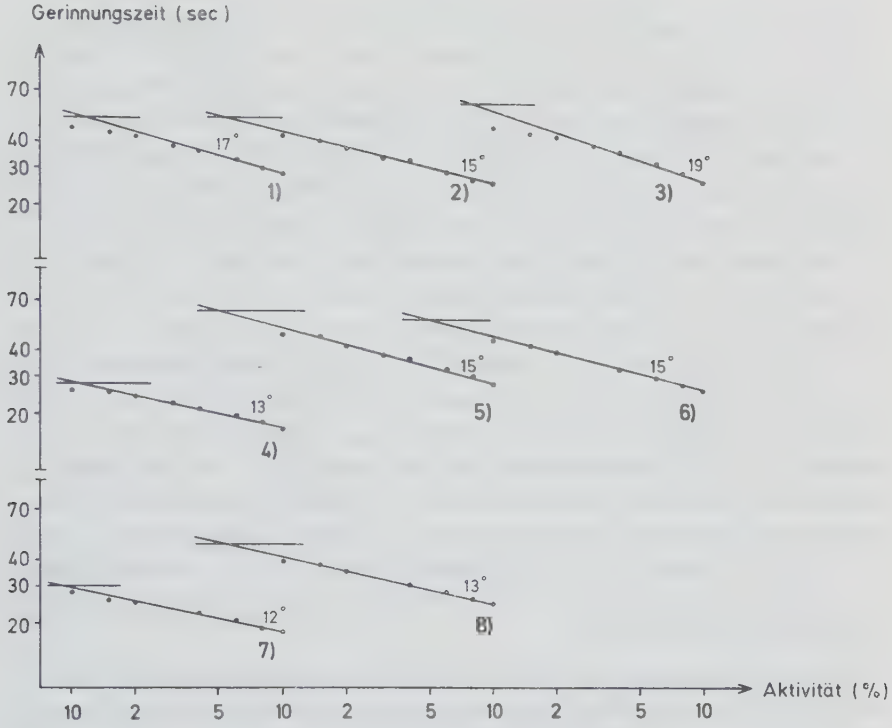


Abb. 19: Bezugskurven modifizierter Faktor VII-Substratplasmen

Die Bezugskurven wurden mit den Substratplasmen erstellt, deren Herstellung auf der gegenüberliegenden Tabelle 6 kurz beschrieben ist. Zur Kennzeichnung der Substratplasmen wurde in der Abbildung und in der Tabelle jeweils dieselbe Nummerierung verwendet.

Tab. 6 : Herstellung und Zusammensetzung von Faktor VII-Substratplasmen, die ← durch Modifikation der Methode von LECHNER und DEUTSCH (161) hergestellt wurden.

Abkürzungen: C = DEAE-Cellulose D = Dialyse
S = DEAE-Sephadex G = Gelfiltration

Faktor VII-Verunreinigung aufwiesen (s. Abb. 17). Da die Aktivität des Faktor X in diesen Präparaten hoch war (300% - 500%), konnten sie bei der Herstellung eines Mangelplasmas stark verdünnt werden, sodaß die Aktivität des Faktors VII in diesen Präparaten weiter vermindert wurde. Da der Prothrombingehalt dieser Präparate aus Schweineplasma ebenfalls sehr niedrig war, kam die Kombination des Faktor X-Präparates mit $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma nicht infrage: In einem solchen Substratplasma hätten die Faktoren VII und II gefehlt; die Methode wäre nicht spezifisch gewesen. Ein Präparat, das sich zur Kombination mit dem Faktor X-Präparat eignet, steht in asbestfiltriertem bovinem Faktor VII/Faktor X-Mangelplasma nach KOLLER und Mitarb. (150) zur Verfügung: es enthält die Faktoren I, II und V.

Zunächst wurde geprüft, ob ein Gemisch aus den Gerinnungsfaktoren dreier Spezies auf Aktivitätsänderungen des humanen Faktors VII reagieren kann. Dazu wurden jeweils 2ml des Faktor VII/X Rindermangelplasmas mit soviel Schweine-Faktor X-Präparat vermischt, daß die Faktor X-Aktivität des neuen Gemischs ca. 50% betrug; je nach Präparat waren hierfür 0,2 bis 0,3ml erforderlich. Die Faktor X-Präparate wurden nicht dialysiert, weil sich nach Dialyse solcher Präparate eine Aktivitätserhöhung des Faktors VII nachweisen ließ (s.S. 81), als deren Ursache eine Aktivierung während der Dialyse nicht sicher ausgeschlossen werden kann.

Derartige Mangelplasmen enthielten Faktor II in einer Aktivität von 39% - 45%, Faktor X in einer Aktivität von 40% - 60% und Faktor VII in einer Aktivität von 9% - 20%. Die Bezugskurven waren im Bereich von 100% - 15% linear, die Neigungswinkel betrugen $13,5^{o}$ bis $14,5^{o}$.

Trotz der relativ hohen Faktor VII-Restaktivität wurde versucht, eine größere Menge eines derartigen Mangelplasmas herzustellen. Das Faktor X-Präparat wurde unter Anwendung der schon beschriebenen Versuchsanordnung (s.S. 79) aus Schweinezitratplasma hergestellt. Es wurden lediglich andere Plasma- und DEAE-Sephadex-Mengen benutzt: Als Ausgangsmaterial wurden 2000ml Schweinezitratplasma verwendet, die Menge des Ionenaustauschers betrug 20g.

Das Faktor X-Präparat wurde in einer solchen Konzentration zu dem asbestfiltrierten Rinderplasma gegeben, daß die Faktor X-Aktivität im Mangelplasma ca. 50% betrug.

Dieses Mangelplasma wies keine Empfindlichkeit gegenüber Faktor VII auf, was sich an dem fast waagerechten Verlauf der Bezugskurve zeigte. Die Versuche wurden daher nicht fortgesetzt.

5.4 Herstellung eines Faktor II-Mangelplasmas aus Rinderplasma

Durch Chromatographie von Rinderzitratplasma an DEAE-Cellulose hatte sich ein prothrombinfreies Konzentrat der Faktoren VII und X herstellen lassen. Fügt man dieses Konzentrat $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma hinzu, so entstent ein Faktor II-Mangelplasma, in dem alle für den Reaktionsablauf des Extrinsic-Systems erforderlichen Gerinnungsfaktoren mit Ausnahme des Prothrombins enthalten sind.

Zur Herstellung des Mangelplasmas wurden die Gerinnungsfaktoren anders als im Vorversuch aus Rinderoxalatplasma an den Ionenaustauscher adsorbiert, weil das bei der Chromatographie im Vorlauf erscheinende Plasma als Faktor I/V-Quelle des Mangelplasmas dienen sollte, nachdem die Reste der Vitamin K-abhängigen Faktoren an $BaSO_4$ adsorbiert waren.

Um einer möglichen Denaturierung der Proteine durch starke pH-Schwankungen vorzubeugen, betrug der pH aller verwendeten Pufferlösungen 7,4. Da der Pufferbereich des Imidazols von pH 6,2 - 7,8 reicht, erschien die Verwendung von Imidazol als Puffersubstanz günstiger als die Verwendung von Tris, das einen Pufferbereich von pH 7,2 - 9,0 aufweist (89).

Das Faktor II-Mangelplasma wurde folgendermaßen hergestellt (s. auch Abb. 20):
30g DEAE-Cellulose wurden zum Quellen in einer Pufferlösung aus 1 Teil 0,2 M Imidazol und 9 Teilen 0,15 M NaCl suspendiert. Der pH dieser Lösung betrug 7,4. Nach dem Quellen wurde die Suspension auf $4^{o}C$ gekühlt und in eine Glassäule (40mm Ø) gefüllt, die ebenfalls auf $4^{o}C$ gekühlt wurde. Die Kühlung wurde während der gesamten Chromatographie fortgesetzt, um einer möglichen Denaturierung der Proteine entgegenzuwirken. Nach dem Packen wurde die Säule mit einer Pufferlösung derselben Zusammensetzung, wie sie zum Quellen des Ionenaustauschers benutzt wurde, äquilibriert.

Das Rinderoxalatplasma wurde in der beschriebenen Weise (s. Methoden) gewonnen. 1500ml Oxalatplasma wurden auf die Säule aufgetragen. Im Plasmavorlauf waren nach Passage der Säule außer Fibrinogen und Faktor V noch geringe Mengen Faktor VII und Faktor II enthalten. Diese wurden im weiteren Verlauf der Herstellung durch Adsorption an $BaSO_4$ entfernt: 100mg $BaSO_4$/ml Plasma wurden zugegeben. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur 30 min. gerührt, danach zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde dekantiert und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

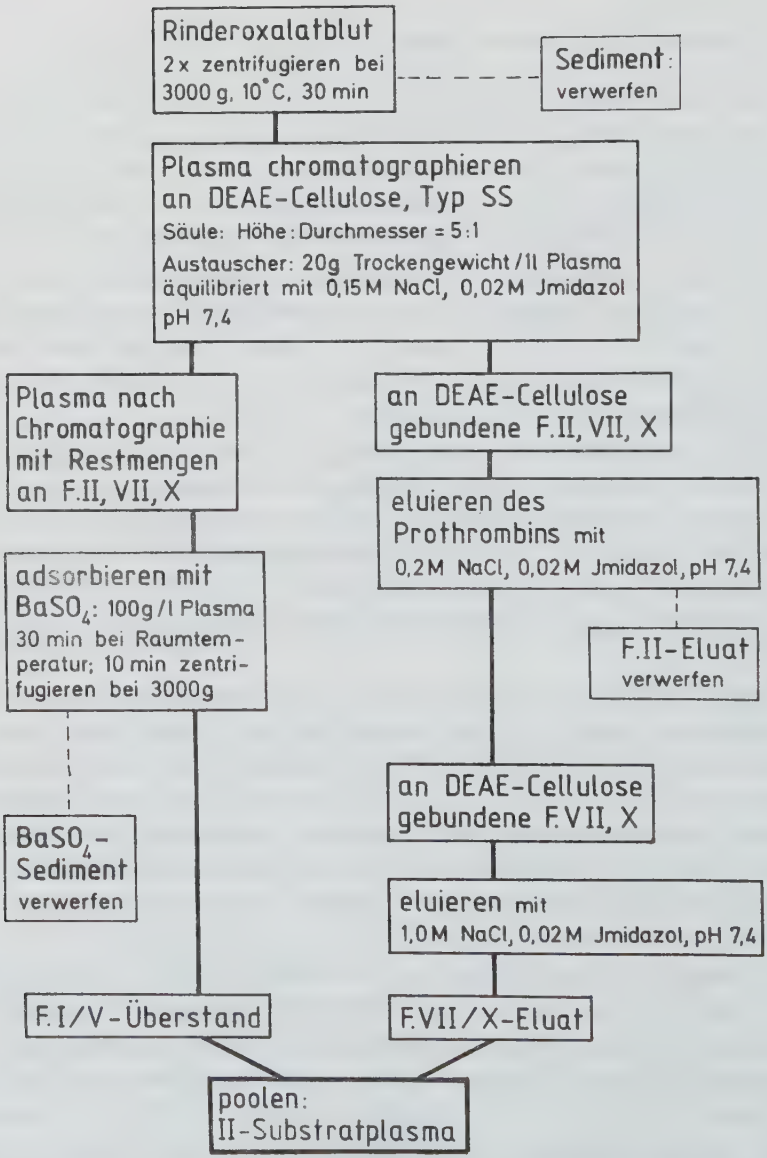


Abb. 20: Vorschrift zur Herstellung eines Faktor II-Substratplasmas aus Rinderoxalatplasma

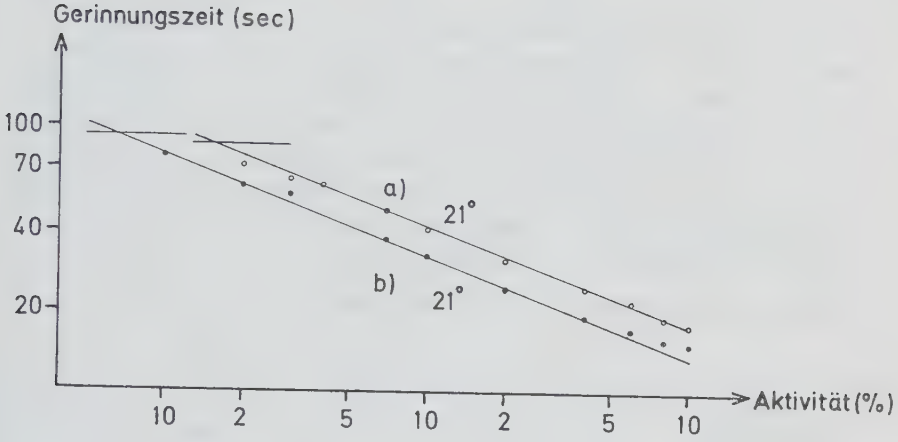


Abb. 21: Bezugskurven der Faktor II-Einstufenmethode unter Verwendung des Rindermangelplasmas.

a) Eine 20-fache Verdünnung des humanen Normalplasmapools entspricht 100%.

b) Eine 10-fache Verdünnung des humanen Normalplasmapools entspricht 100%.

Nach dem vollständigen Eindringen des Plasmas in die Säule wurden die nicht gebundenen Proteine sowie das an den Ionenaustauscher gebundene restliche Prothrombin mit einer Pufferlösung aus 0,02 M Imidazol, 0,20 M NaCl, pH 7,4, eluiert. Die Elution wurde solange fortgesetzt, bis kein Faktor II mehr im Eluat nachweisbar war. Danach wurde die Elution zur Sicherheit noch mit 100ml der Pufferlösung weitergeführt. Die Fließgeschwindigkeit bei diesen Präparationsschritten betrug 100ml/h, $\triangleq$ 8ml/(h x cm^2). Darauf folgte die Elution der Faktoren VII und X mit einem Puffer aus 1,0 M NaCl und 0,02 M Imidazol bei einem pH von 7,4. Die Fließgeschwindigkeit war 60ml/h, $\triangleq$ 5ml/(h x cm^2). Das Eluat wurde in Fraktionen zu 5ml gesammelt; die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden gepoolt. Die Aktivitäten der Faktoren VII und X im Pool betrugen ca. 3000%. Von diesem Pool wurde soviel zu dem $BaSO_4$-adsorbierten Plasma gegeben, bis die Faktor X-Aktivität des Gemischs ca. 100% betrug. Damit waren in diesem Pool alle für ein spezifisches Faktor II-Mangelplasma erforderlichen Gerinnungsfaktoren vorhanden. Das Mangelplasma wurde nach der Fertigstellung in Portionen zu 2ml eingefroren und bei -40°C gelagert.

Die Aktivitäten der Faktoren in dem Substratplasma waren:

	II	V	VII	X
Fibrinogen ca. 310 mg%	Ø	500%	70%	90%

Zur Erstellung von Bezugskurven der Faktor II-Rindersubstratplasmamethode wurde ein humaner Normalplasmapool zunächst 10-fach verdünnt und die Aktivität dieser Verdünnung gleich 100% gesetzt. Die Bezugskurven waren bei der Wahl dieser Verdünnung von 40% - 1% linear (s.Abb. 21, Kurve b). Im Aktivitätsbereich oberhalb 40% lagen die Punkte oberhalb der gezeichneten Geraden. Bei Verwendung einer 20-fachen Verdünnung des Normalplasmapools als 100%-Referenzwert zeigte sich eine Linearität der Bezugskurve im Aktivitätsbereich von 100% - 3% (Abb. 21, Kurve a). Der Neigungswinkel der Bezugskurven betrug bei der Wahl beider Verdünnungen 21°. Die Empfindlichkeit des Mangelplasmas gegenüber Änderungen der Aktivität des Prothrombins,die in der Linearität und dem Neigungswinkel der Bezugskurven zum Ausdruck kommt, erwies sich damit als gut.

Zur Überprüfung der Stabilität des Mangelplasmas wurden mehrere Bezugskurven im Abstand von einigen Wochen angefertigt; dabei zeigte sich keine Änderung der Linearität und des Neigungswinkels (s. Abb. 22).

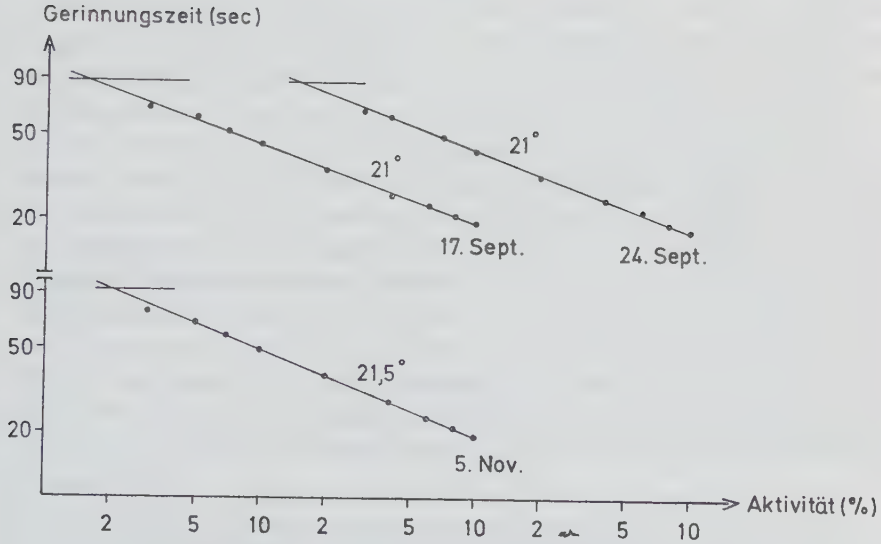


Abb. 22: Stabilitätsprüfung des Faktor II-Rindersubstratplasmas anhand von Bezugskurven, die im Abstand von mehreren Wochen angefertigt wurden. Die 20-fache Verdünnung eines humanen Normalzitratplasmapools entspricht 100%.

5.5 Herstellung eines Faktor X-Mangelplasmas aus Schweineplasma

5.5.1 Entwicklung der Präparationsmethode

Die Vorversuche hatten gezeigt, daß der Faktor X aus einer Schweineplasmaverdünnung weitgehend an DEAE-Ionenaustauscher adsorbiert werden kann, während die Faktoren II und VII nur zu einem geringen Ausmaß gebunden werden; Fibrinogen und Faktor V werden nicht gebunden. Damit waren die Möglichkeiten zur Herstellung eines Faktor X-Mangelplasmas gegeben, vorausgesetzt, der Faktor X ließ sich auch aus unverdünntem Plasma mit diesem Verfahren weitgehend entfernen.

Aus diesem Grund wurden 20g DEAE-Sephadex zum Quellen in einem Puffer aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 4 Teilen 0,15 M NaCl, pH 7,5, suspendiert. Nach dem Quellen wurde der Ionenaustauscher in eine Glassäule gefüllt und mit dem Quellpuffer äquilibriert. 1000ml Schweinezitratplasma, die auf die übliche Weise gewonnen worden waren, wurden auf die Säule aufgetragen. Das Schweinezitratplasma enthielt nach der Passage durch die Ionenaustauschersäule keine meßbare Faktor X-Aktivität, während die anderen für ein spezifisches Faktor X-Mangelplasma erforderlichen Faktoren I, II, V, VII in ausreichender Konzentration nachweisbar waren. Die Bezugskurven, die unter Verwendung dieser ersten Charge des Faktor X-Mangelplasmas erstellt wurden, wiesen eine Linearität im log/log-System im Aktivitätsbereich von 100% - 5% auf.

5.5.1.1 Auswahl des günstigsten pH-Bereichs und des Ionenaustauschers

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß sich durch Säulenchromatographie an DEAE-Sephadex aus Schweineplasma ein Faktor X-Substratplasma herstellen ließ, sollten in den folgenden Versuchen die Bedingungen erarbeitet werden, unter denen eine optimale Bindung des Faktors X an einen DEAE-Ionenaustauscher bei ausreichender Ausbeute an Substratplasma erfolgt. Dazu wurde zunächst das Bindungsverhalten des Faktor X an DEAE-Sephadex bei pH 7,5 und bei pH 9,0 untersucht. DEAE-Sephadex wurde zunächst deshalb bevorzugt, weil dieser Austauscher günstigere Durchflußeigenschaften aufweist als DEAE-Cellulose. Der Versuch bei pH 9,0 sollte Aufschluß darüber geben, ob eine Erhöhung der negativen Nettoladung, wie sie bei einer Erhöhung des pH's bei Proteinen oberhalb des IEP auftritt, eine verbesserte Bindung des Faktors X an den Ionenaustauscher zur Fol-

ge hat. Ein Versuch bei niedrigerem pH, z.B. 5,8, wurde nicht durchgeführt, da eine hierdurch bedingte Verminderung der Nettoladung keine Verbesserung der Bindungseigenschaften erwarten ließ. Ein dritter Versuch wurde unter Verwendung von DEAE-Cellulose bei einem pH von 7,5 durchgeführt, um einen möglichen Einfluß der Ionenaustauschermatrix auf die Bindungscharakteristik zu untersuchen.

Die Untersuchungen wurden mit Plasmamengen von jeweils ca. 450ml durchgeführt.

In den ersten beiden Versuchen wurden jeweils 1,5g DEAE-Sephadex nach dem Quellen in die Glassäulen gefüllt und mit einer Pufferlösung aus 0,02 M Tris, 0,14 M NaCl äquilibriert. Der pH der Pufferlösung betrug im ersten Versuch 7,5, im zweiten 9,0. Die Säulen wurden bereits beim Füllen mit der DEAE-Sephadex-Suspension wie auch im weiteren Verlauf der Versuche auf 4^{o}C gekühlt. Das in diesen Versuchen verwendete Oxalatplasma wurde gegen den Startpuffer dialysiert und vor der Chromatographie auf 4^{o}C vorgekühlt. Anschließend wurde das Plasma auf die Säulen aufgetragen. Nach dem Durchlauf durch die Säule wurde das Plasma in Fraktionen zu 3,5ml aufgefangen. Die Aktivität der Faktoren II, VII und X wurde bestimmt. Dabei mußte zur Bestimmung des Faktors VII natürliches Mangelplasma verwendet werden, weil die Anwendung der KOLLER'schen Methode unter Verwendung von asbestfiltriertem Faktor VII/X-Mangelplasma (150) wegen der fehlenden Faktor X-Aktivität in den Fraktionen nicht möglich war.

Während im ersten Versuch bei pH 7,5 der Faktor X in keiner Fraktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 23a), war im zweiten Versuch bei pH 9,0 der Faktor X ab Fraktion 70 meßbar (Abb. 23b). In den nachfolgenden Fraktionen nahm die Faktor X-Aktivität kontinuierlich zu, bis die Faktor X-Bindungsfähigkeit des Gels nach Fraktion 120 (ca. 420ml) erschöpft war. Somit zeigte sich eine deutlich höhere Faktor X-Bindungskapazität des DEAE-Sephadex bei pH 7,5.

Der letzte Versuch dieser Reihe wurde in gleicher Versuchsanordnung bei einem pH von 7,5 mit DEAE-Cellulose als Austauscher durchgeführt. Um das Resultat dieses Versuchs mit den vorherigen vergleichen zu können, mußte die Kapazität der Cellulose-Säule der Kapazität der Sephadex-Säulen entsprechen. Da die für große Moleküle ausnutzbare Kapazität des DEAE-Sephadex A 25 ca. 10% der Gesamtkapazität beträgt, wie sich aus dem Vergleich von Hämoglobinbindungskapazität und Gesamtkapazität (222) abschätzen läßt, ist bei einer Kapazität der DEAE-Cellulose von 0,72meq/g etwa die halbe Menge DEAE-Cellulose er-

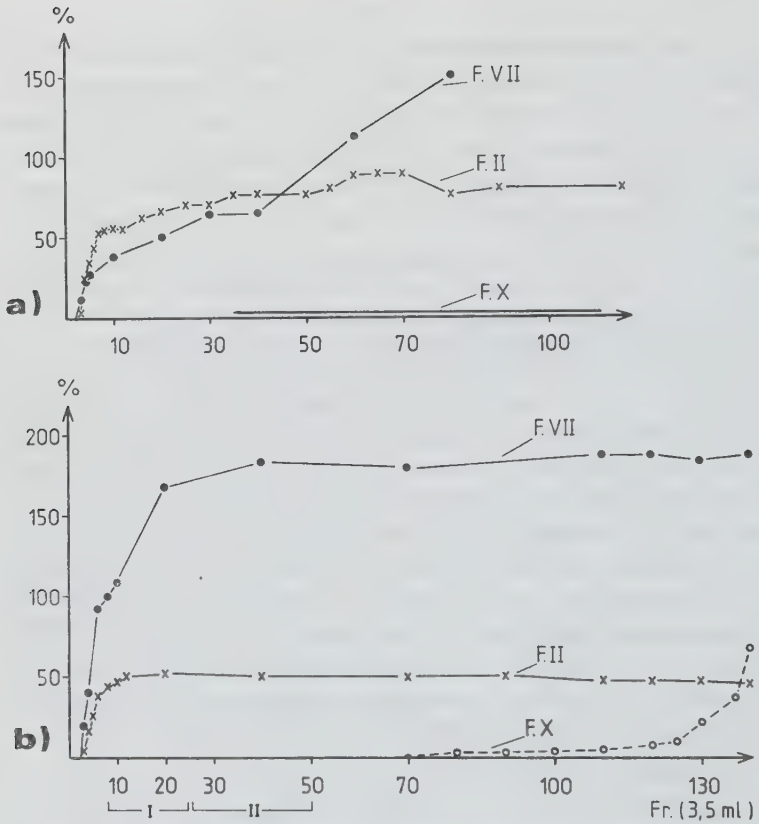


Abb. 23: Vergleich der Ergebnisse der Chromatographie von Schweineoxalatplasma an DEAE-Sephadex bei pH 7,5 a) und 9,0 b)

450ml Schweineoxalatplasma, das gegen einen Puffer aus 0,01 M Tris und 0,14 M NaCl dialysiert war, wurde an 1,5g DEAE-Sephadex chromatographiert. Der Ionenaustauscher war vorher mit dem Dialysepuffer äquilibriert worden. Bei dem Versuch in Abbildung a) betrug der pH des Dialysepuffers 7,5, der pH in Abbildung b) 9,0. In Versuch a) wurden die Fraktionen 20-50 gepoolt und als Substratplasma verwendet.

In Versuch b) wurden die Fraktionen 8-25 (Pool I) und 26-50 (Pool II) als Substratplasmen verwendet.

forderlich, um eine vergleichbare ausnutzbare Kapazität der Säulen zu erzielen.

Der Versuch wurde, bis auf die Verwendung von 0,8g DEAE-Cellulose, in gleicher Versuchsanordnung wie der DEAE-Sephadex-Versuch bei pH 7,5 durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 24a dargestellt. Ein Vergleich mit dem ersten Versuch (Abb. 24b), der bis auf die andere Ionenaustauschermatrix unter denselben Bedingungen ablief, zeigt eine sehr viel geringere Faktor X-Bindungsfähigkeit der DEAE-Cellulose. Während in keiner der Fraktionen des Sephadex-Versuchs Faktor X entdeckt werden konnte, wurde Faktor X ab der 50. Fraktion des Cellulose-Versuchs in kontinuierlich steigender Aktivität gemessen.

In allen drei Versuchen wurden die Faktor X-freien Fraktionen zu einem oder zwei Pools vereinigt, gegen Michaelis-Puffer, pH 7,42 dialysiert und auf ihre Tauglichkeit als Faktor X-Mangelplasma geprüft.

Tab. 7 gibt die Fraktionen an, aus denen in den drei Versuchen die Faktor X-Mangelplasmen hergestellt wurden, sowie den Faktorengehalt der Mangelplasmen. Faktor X war in keinem Mangelplasma nachweisbar; jedes Mangelplasma weist eine ausreichende Aktivität der übrigen für den Reaktionsablauf des Extrinsic-Systems erforderlichen Gerinnungsfaktoren auf.

Herstellung aus:	F.II	F.V	F.VII	F.X	Fbg (mg/100ml)
DEAE-Sephadex-Versuch, pH 7,5					
Fraktion 20 - 50	38%	1320%	32%	0%	454
DEAE-Sephadex-Versuch, pH 9,0					
Pool I, Fraktion 8 - 25	35%	700%	120%	0%	265
Pool II, Fraktion 26 - 50	37%	930%	138%	0%	242
DEAE-Cellulose-Versuch, pH 7,5					
Fraktion 12 - 40	41%	800%	70%	0%	384

Tab. 7: Faktorengehalt der Faktor X-Mangelplasmen, die durch Poolen der angegebenen Fraktionen aus den in diesem Abschnitt beschriebenen Versuchen (s.auch Abb. 23 und 24) und anschließende Dialyse gegen Michaelis-Puffer, pH 7,42, hergestellt wurden.

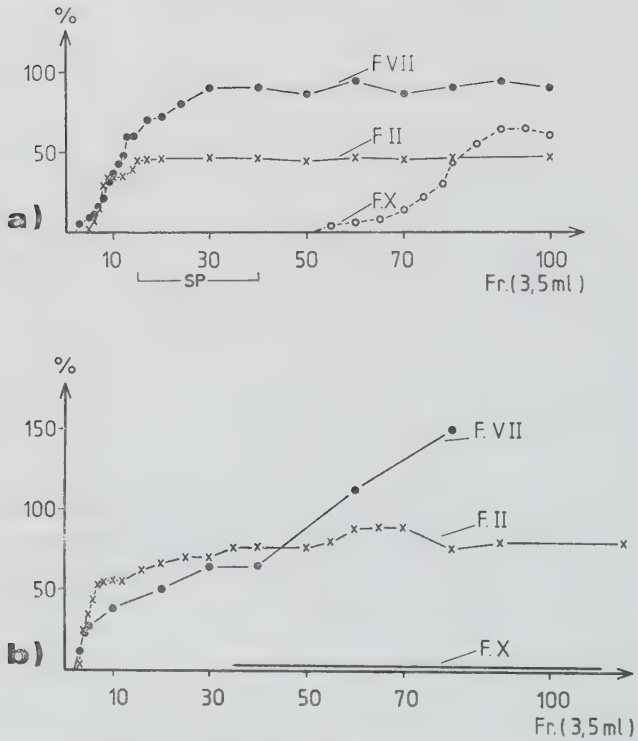


Abb. 24: Vergleich der Ergebnisse der Chromatographie von Schweineoxalatplasma an einer DEAE-Cellulose-Säule (a) und einer DEAE-Sephadex-Säule (b) von etwa gleicher ausnutzbarer Kapazität

Dazu wurde je 450ml Schweineoxalatplasma gegen einen Puffer aus 0,01 M Tris und 0,14 M NaCl, pH 7,5, dialysiert. Die Chromatographie des dialysierten Plasmas erfolgte an ca. 0,8g DEAE-Cellulose (a) und an 1,5g DEAE-Sephadex A 25 (b). Beide Ionenaustauscher waren mit dem Dialysepuffer äquilibriert worden.
Die Fraktionen 12 - 40 in Abb. a) (mit SP bezeichnet) wurden gepoolt und als Substratplasma (SP) verwendet.
Abb. b) ist identisch mit Abb. 23a; sie wurde noch einmal gezeigt, um die Ergebnisse der beiden Versuche besser vergleichen zu können.

Die Bezugskurven des Mangelplasmas, das aus den Fraktionen 20 - 50 des DEAE-Sephadex-Versuchs bei pH 7,5 hergestellt wurde, zeigten im log/log-System eine Linearität im Bereich von 100% - 3%, der Neigungswinkel zur Abszisse betrug 13^{o}.

Ein Vergleich der Bezugskurven, die unter Verwendung der Mangelplasmen aus den Pools I bzw. II des DEAE-Sephadex-Versuchs bei pH 9,0 erstellt worden waren, zeigte Unterschiede in der Qualität dieser beiden Mangelplasmen.

Wie DENSON (47) und BACHMANN und Mitarb. (18) bei der Herstellung ihres VII/X-Mangelplasmas festgestellt hatten, reichten schon Spuren der Faktoren VII und X in ihren Substratplasmen aus, um den Neigungswinkel der Bezugskurven zu verringern. Eine Beeinträchtigung des Mangelplasmas durch Faktor X-Restaktivität scheint auch in dem DEAE-Sephadex-Versuch bei pH 9,0 aufgetreten zu sein, obwohl hier wie auch in dem DEAE-Sephadex-Versuch bei pH 7,5 und dem DEAE-Cellulose-Versuch nur aus den Fraktionen Mangelplasma hergestellt wurde, die keinen nachweisbaren Faktor X enthielten (S. Abb. 23 und 24): Die Fraktionen 8 - 25 des pH 9-Versuchs (Pool I, Abb. 23b) ergaben ein Substratplasma, dessen Bezugskurve einen Neigungswinkel von 14^{o} hatte (Abb. 25, Kurve a); die Kurve war linear bis zu einer Aktivität von 3%. Das zweite Mangelplasma aus den Fraktionen 26 - 50 desselben Versuchs (Pool II, Abb. 23b) ergab eine Bezugskurve mit einem Neigungswinkel von 12^{o} (Abb. 25, Kurve b); sie war nur noch bis 7% linear. Der Unterschied der Reaktionszeit zwischen 100%- und 0%-Wert war bei dem Pool I-Mangelplasma um 20 Sekunden länger als beim Pool II-Mangelplasma. Anscheinend können geringe Restaktivitäten an Faktor X im Schweinemangelplasma die Qualität beeinträchtigen, auch wenn sie mit der Methode von BACHMANN (18) noch nicht nachweisbar sind (s. Tab. 7).

Das Mangelplasma, das in dem Versuch unter Verwendung von DEAE-Cellulose aus den Fraktionen 12 - 40 (s. Abb. 24a) hergestellt wurde, zeigt nur eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen der Faktor X-Aktivität: Der Neigungswinkel der Bezugskurve betrug nur 10^{o}, der Unterschied zwischen der Reaktionszeit des 100%- und des 0%-Wertes betrug nur 10 Sekunden. Als Ursache sind auch in diesem Fall Faktor X-Spuren zu vermuten, obwohl weder in diesem Substratplasma (Tab. 7) noch in den Fraktionen des chromatographierten Plasmas, aus denen das Mangelplasma hergestellt wurde (Abb. 24a), Faktor X nachgewiesen werden konnte.

Die Versuche zeigten, daß eine Erhöhung des pH's auf 9,0 bei der Chromatographie nicht zu einer Verbesserung der Faktor X-Bindung führt. Weiterhin zeig-

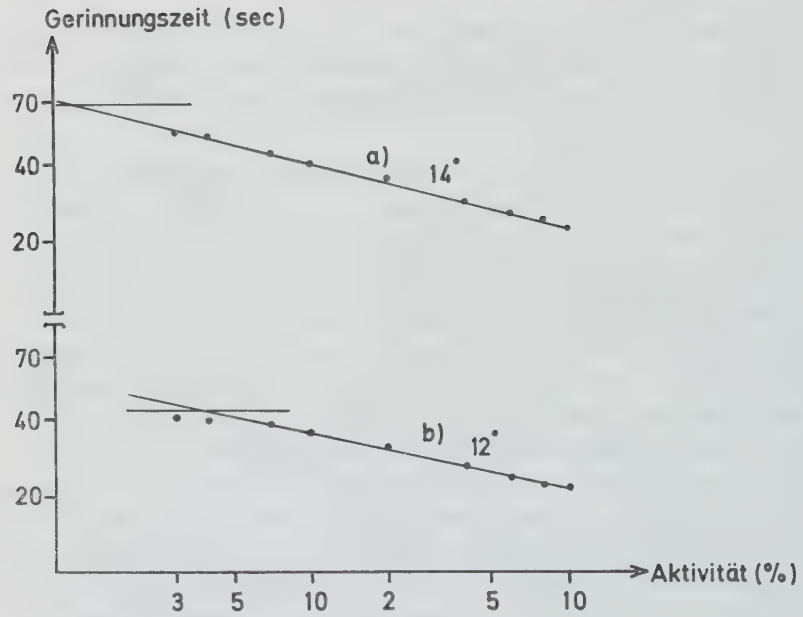


Abb. 25: Vergleich der Bezugskurven von Substratplasmen, die aus verschiedenen Fraktionen eines an DEAE-Sephadex chromatographierten Schweineplasmas hergestellt wurden

500ml Schweineoxalatplasma wurden gegen einen Puffer aus 0,01 Tris, 0,14 M NaCl, pH 9,0, dialysiert und bei diesem pH an 1,5g DEAE-Sephadex chromatographiert. Das Ergebnis der Chromatographie ist in Abb. 23b gezeigt.
Die Fraktionen wurden gepoolt, wobei die Fraktionen 8 - 25 den Pool I ergaben, die Fraktionen 26 - 50 den Pool II. Beide Pools wurden gegen Michaelis-Puffer, pH 7,42, dialysiert und als Faktor X-Substratplasma verwendet.
Pool I ergab die Kurve a), Pool II die Kurve b).
Der Vergleich von Linearität und Neigungswinkel beider Kurven zeigt eine deutlich geringere Empfindlichkeit des Pools II (Kurve b) gegenüber Veränderungen der Faktor X-Aktivität und weist auf eine mögliche, anders nicht nachweisbare höhere Faktor X-Restaktivität im Pool II hin.

te sich, daß DEAE-Cellulose bei vergleichbarer ausnutzbarer Kapazität eine geringere Faktor X-Bindungskapazität besitzt. Bei der Herstellung von Mangelplasmen hätte sich diese geringere Faktor X-Bindungskapazität durch die Verwendung einer höheren Ionenaustauschermenge ausgleichen lassen; da aber das Sephadex-Gel aufgrund seiner Partikelform die besseren Durchflußeigenschaften aufweist, wurde zur Präparation weiterer Mangelplasmen nur noch DEAE-Sephadex verwendet.

5.5.1.2 Herstellung großer Chargen

Nachdem sich somit für die Herstellung des Faktor X-Substratplasmas die Chromatographie an DEAE-Sephadex bei einem pH von 7,5 als beste Modifikation herausgestellt hatte, sollten die Bedingungen erarbeitet werden, unter denen sich eine große Charge Substratplasma auf möglichst einfache Weise herstellen läßt. Gleichzeitig sollte der Einfluß des Antikoagulans Oxalat bzw. Zitrat auf das Ergebnis der Chromatographie untersucht werden. Das Oxalat- bzw. Zitratplasma wurde auf die übliche Weise (s. Methoden) gewonnen. Zur Chromatographie wurden nur Plasmen mit einem Prothrombingehalt $\geq$ 60% verwendet. Eine Aktivität im Ausgangsplasma $\leq$ 60% hätte eine zu niedrige Prothrombinaktivität im Mangelplasma ergeben, da auch Prothrombin zu einem Teil an den Ionenaustauscher gebunden wird (s. Abb. 17, 30).

Das Quellen des DEAE-Sephadex erfolgte in einer Pufferlösung aus 0,02 M Tris, 0,14 M NaCl, pH 7,5. In den Versuchen, in denen Schweinezitratplasma als Ausgangsmaterial verwendet wurde, enthielt die Pufferlösung zusätzlich 0,022 M Natrium-Zitrat. Nach dem Quellen wurde das DEAE-Sephadex auf $4^{o}C$ vorgekühlt und in die Glassäule gefüllt, die während des gesamten Versuchsablaufs auf $4^{o}C$ gekühlt blieb. Die Ionenaustauscher-Säule wurde mit dem Quell-Puffer äquilibriert. Zur Präparation wurden jeweils 2,3 Liter Oxalat- bzw. Zitratplasma verwendet. Den Plasmen wurde Trispuffer in einer Endkonzentration von 0,02 M zugegeben, der pH auf 7,5 eingestellt. Nach diesen Vorbereitungen wurden die Plasmen auf die Säulen aufgetragen.

Die Durchflußgeschwindigkeit betrug ca. 20ml/(h x cm^2). Das chromatographierte Plasma wurde in 100ml-Kolben aufgefangen; die Aktivität der Faktoren II, V, VII, X sowie die Fibrinogenkonzentration wurden bestimmt. Dabei wurde wegen des Fehlens von Faktor X im chromatographierten Plasma zur Bestimmung des Faktors VII ein natürliches Substratplasma verwendet (s. auch S. 99).

Die erste große Charge wurde aus 2,3 l Oxalatplasma hergestellt. Dabei stellte sich heraus (s. Abb. 26a), daß die Faktoren II und VII stärker an den Ionenaustauscher gebunden wurden, als nach den Vorversuchen (Abb. 23 und 24) zu erwarten war. Als Ursache kann die relativ größere Austauschermenge vermutet werden. Faktor X wurde im chromatographierten Plasma nicht gefunden. Fibrinogen und Faktor V wurden wie in den Vorversuchen nicht an den Austauscher gebunden.

Das Substratplasma sollte mit einem Mindestgehalt von 40% Prothrombin hergestellt werden. Da die Prothrombin- ebenso wie die Prokonvertin-Werte im chromatographierten Oxalatplasma nur sehr langsam anstiegen, wurde ein Prothrombinwert von 40% erst in Fraktion 17 erreicht. Die Fraktionen 17 - 22 wurden daher gepoolt und als Mangelplasma eingesetzt.

Das Substratplasma hatte folgende Zusammensetzung:

Fbg.	II	V	VII	X
306mg%	35%	1800%	42%	0%

Auffallend ist die gegenüber dem unbehandelten Schweineoxalatplasma deutlich verminderte Aktivität der Faktoren II und VII.

Dagegen erwies sich die Verwendung von Zitratplasma für die Gewinnung des Faktor X-Mangelplasmas als wesentlich vorteilhafter. Wie bei der Verwendung von Oxalatplasma erreichten die Faktoren I und V im Durchlauf schnell die Werte des Ausgangsplasmas (Abb. 26b); der Anstieg der Prothrombin- und Prokonvertin-Aktivität erfolgte im chromatographierten Zitratplasma viel schneller. Die Prothrombin-Aktivität lag schon in der 3. Fraktion über 40%, die Aktivität des Faktors VII über 150%. Faktor X war auch bei diesem Versuch in keiner Fraktion nachweisbar.

Einschließlich des gerade erwähnten Versuchs wurden insgesamt zwei Versuche mit Schweinezitratplasma als Ausgangsmaterial in derselben Versuchsanordnung durchgeführt und die Gerinnungsaktivitäten in den Fraktionen bestimmt. Die Fraktionen mit einem Prothrombingehalt von über 40%-Pools wurden gepoolt; es wurden jeweils zwei Pools gebildet, wobei Pool I die ersten 13 bzw. 15 Fraktionen umfaßte und Pool II jeweils die Fraktionen 18 - 23.

Mit der Bildung dieses zweiten Pools sollte untersucht werden, ob 30g DEAE-Sephadex ausreichen, die Moleküle des in 2,3 l Plasma enthaltenen Faktors X zu binden oder ob es wie in einem der Vorversuche (s.S. 103) zu einer Verunreini-

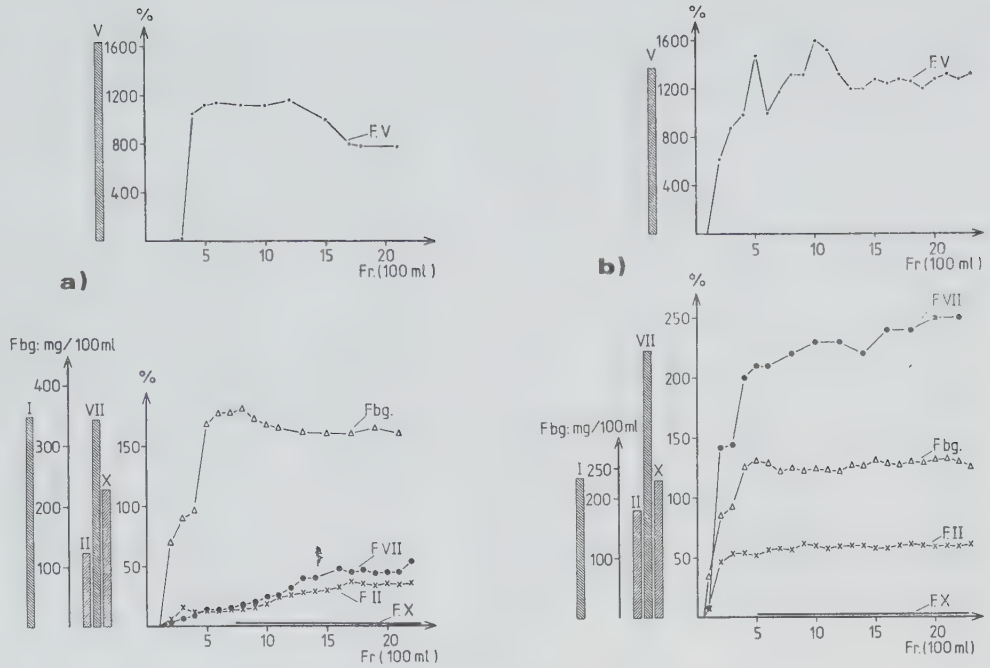


Abb. 26: Herstellung großer Chargen des Faktor X-Substratplasmas aus Schweineplasma

2,3 l Schweineoxalatplasma (a) und 2,3 l Schweinezitratplasma (b) wurden an je 30g DEAE-Sephadex chromatographiert.

Die Säulen vor den Diagrammen geben die Aktivitäten im Ausgangsplasma an.

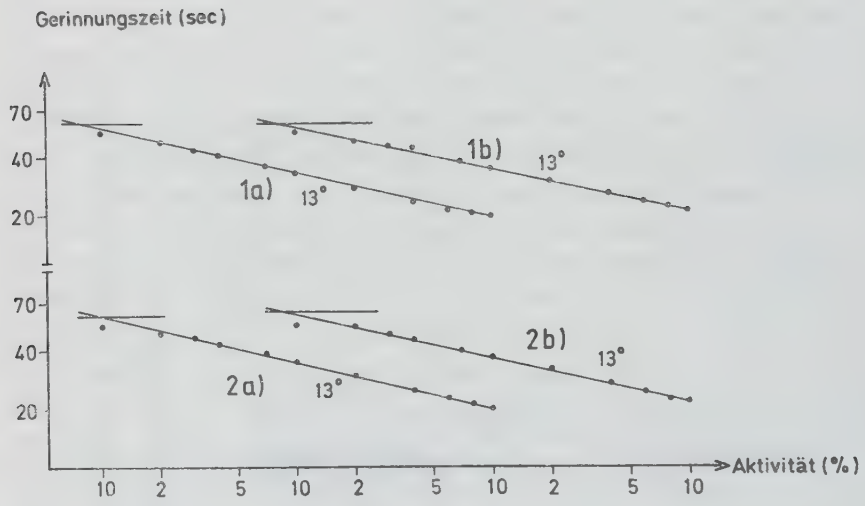


Abb. 27: Bezugskurven von Faktor X-Substratplasmen, die aus den ersten verwendbaren 13 bzw. 15 und den letzten 6 Fraktionen von je 2,3 l an DEAE-Sephadex chromatographiertem Schweinezitratplasma hergestellt wurden

Die Kurven 1a und 2a wurden mit den Substratplasmen aus den Fraktionen 3 - 17 bzw. 5 - 17 des chromatographierten Schweineplasmas angefertigt, die Kurven 1b und 2b jeweils aus den Fraktionen 18 - 23.
Durch den Vergleich von Linearität und Neigungswinkel der Bezugskurven sollte festgestellt werden, ob die Pools aus den jeweils letzten 6 Fraktionen mit Spuren von nicht an den Austauscher gebundenem Faktor X verunreinigt und somit zur Herstellung eines Faktor X-Mangelplasmas weniger gut geeignet sind.

gung des Mangelplasmas durch Spuren von nicht gebundenem Faktor X kommt. Um dies zu erkennen, reicht der Nachweis der Abwesenheit des Faktors X in den chromatographierten Fraktionen offensichtlich nicht aus (s.S.100); zum Teil könnte eine geringe Empfindlichkeit der Methode von BACHMANN und Mitarb. (18) für den Faktor X des Schweins hierfür verantwortlich sein. Durch einen Vergleich von Neigungswinkel und linearem Verlauf der Bezugskurven dieser Mangelplasmen lassen sich die Faktor X-Spuren eher erfassen (s.S.103, Abb. 25).

Die Bezugskurven der Pools I aus den Fraktionen 3 bzw. 5 - 17 sowie der Pools II aus den Fraktionen 18 - 23 (s. Abb. 27) der beiden Zitratplasmaversuche, deren Ergebnisse zusammen in Abb. 30 dargestellt sind, zeigen keinen erkennbaren Unterschied in Neigungswinkel und Linearität. Damit dürfen 30g DEAE-Sephadex für die Präparation des Mangelplasmas aus 2,3 l Schweineplasma als ausreichend angesehen werden.

Bei der Herstellung dieser großen Chargen Faktor X-Substratplasma wurde auf eine Dialyse gegen den Startpuffer vor der Chromatographie verzichtet, um die Methode möglichst unkompliziert zu halten. Die Konzentration von 0,02 M Trispuffer im Plasma konnte allerdings den auf 7,5 eingestellten pH bei der Chromatographie nicht konstant halten. Er stieg in den ersten Fraktionen von 7,6 auf 7,9; erst in den Fraktionen 20 - 22 sank der pH auf Werte von ca. 7,8. Die erfolgreiche Herstellung der Mangelplasmen zeigte jedoch, daß ein konstanter pH während der Präparation nicht erforderlich ist. Aus diesem Grunde wurde bei der Präparation weiterer Mangelplasmachargen dem Schweineplasma weder Trispuffer zugefügt noch der pH des Plasmas eingestellt. Die Qualität der mit diesen Modifikationen hergestellten Mangelplasmen wurde dadurch nicht verschlechtert.

5.5.1.3 Einfluß der Dialyse auf die Qualität des Mangelplasmas

Die Hälfte des Oxalat-Mangelplasmas und jeweils die Hälfte der aus den Fraktionen 5 - 17 bzw. 3 - 17 hergestellten (Pool I) Zitrat-Mangelplasmen wurden gegen Michaelis-Puffer, pH 7,42, dialysiert. Damit hatten die Mangelplasmen dieselbe Elektrolyt-Zusammensetzung wie der Puffer, der bei der Durchführung der Bestimmung zur Verdünnung des Normalplasma-Pools verwendet wurde. Es sollte geprüft werden, ob sich dadurch die Qualität der Substratplasmen verbessern ließ. Als Kriterien für die Qualität galten die Zusammensetzung der Substratplasmen sowie Linearität und Neigungswinkel der Bezugskurven. Während der

Dialyse nahm die Aktivität fast aller Gerinnungsfaktoren in den Substratplasmen ab (Tab. 8):

		F.II	F.V	F.VII	Fbg (mg/100ml)
1) Oxalat-MP:	vor Dialyse	35%	1800%	42%	306
	nach Dialyse	35%	1120%	39%	330
2) Zitrat-MP:	vor Dialyse	49%	2200%	140%	384
	nach Dialyse	37%	900%	90%	302
3) Zitrat-MP:	vor Dialyse	60%	2200%	220%	254
	nach Dialyse	50%	1380%	200%	228

Tab. 8: Faktorengehalt der aus Schweineoxalat- bzw. Schweinezitratplasma hergestellten Faktor X-Mangelplasmen vor und nach Dialyse gegen Michaelis-Puffer, pH 7,42.

Gleichzeitig änderte sich der Verlauf der Bezugskurven (s. Abb. 28). Beim nicht dialysierten Substratplasma zeigte sich im doppelt logarithmischen System eine lineare Bezugskurve von 100% bis fast 1%, bei den dialysierten Plasmen war in einem Fall die Kurve nur im Aktivitätsbereich von 100% - 7% linear. Der Schnittpunkt der Bezugskurven und des Pufferleerwertes liegt bei den nicht dialysierten Substratplasmen unter 1%; bei den dialysierten liegt er zwischen 1% und 3%. Die Änderungen der Zusammensetzung der Substratplasmen durch die Dialyse sind nicht so schwerwiegend, daß man daraus eine Qualitätsminderung der Mangelplasmen entnehmen sollte (s. Tab. 8). Aus dem Vergleich der Bezugskurven (Abb. 28) läßt sich jedoch erkennen, daß ohne Dialyse leistungsfähigere Mangelplasmen hergestellt werden können.

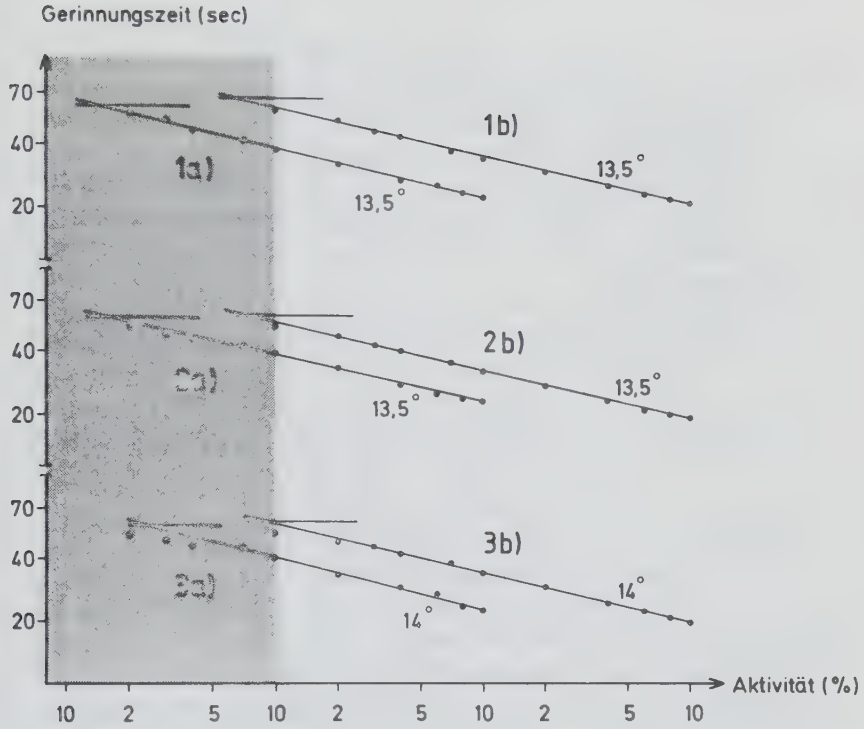


Abb. 28: Effekt der Dialyse gegen Michaelis-Puffer, pH 7,42, auf die Bezugskurven von Faktor X-Schweinemangelplasma

Zum Vergleich wurden Bezugskurven mit dialysiertem (a) und nicht dialysiertem (b) Mangelplasma angefertigt. Für die Kurven 1a/1b wurde aus Oxalatplasma gewonnenes Mangelplasma verwendet, für die Kurven 2a/2b sowie 3a/3b aus Zitratplasma gewonnenes Mangelplasma.
Das Raster kennzeichnet den Aktivitätsbereich von unter 1% für die mit b) bezeichneten Bezugskurven.

5.5.1.4 Vorschrift für die routinemäßige Herstellung von Schweine-Faktor X-Mangelplasma

In den bisherigen Modifikationen der Versuchsanordnung, die unter anderem in der Variation des pH's und des Ionenaustauschers sowie in der Durchführung einer Dialyse des Mangelplasmas gegen Michaelis-Puffer, pH 7,42, bestanden, wurde versucht, die optimalen Bedingungen für eine einfache Präparation eines leistungsfähigen Faktor X-Mangelplasmas zu finden. Unter Berücksichtigung der gewonnenen Ergebnisse wurde die im folgenden beschriebene Vorschrift zur Präparation des Mangelplasmas entwickelt (s. auch Abb. 29). Dabei wurden weitere Vereinfachungen eingeführt.

30g DEAE-Sephadex A 25 wurden in einer Lösung aus 1 Teil 3,8% Natrium-Zitrat und 4 Teilen 0,15 M NaCl zum Quellen gebracht. Der pH dieser Lösung wird nicht eingestellt, er beträgt ca. 7,7. Nach dem Quellen wird der Ionenaustauscher in eine Glassäule gefüllt. Die Ionenaustauscher-Säule wird mit 500ml der gleichen Natrium-Zitrat/NaCl-Lösung äquilibriert.

Schweinezitratblut wird auf die übliche Weise gewonnen. Das Blut mit einer Plasmaprothrombinaktivität über 60% wird 30 Minuten bei 3000 x g, 10°C, zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wird das überstehende Plasma abgehebert und nochmals bei 3000 x g, 10°C, zentrifugiert. Das überstehende Plasma wird abgehebert. Ca. 2,3 l Zitratplasma werden auf die Säule aufgetragen; eine Kühlung der Säule während der Chromatographie erfolgt nicht. Die Durchflußgeschwindigkeit wird auf 20ml/(h x cm^2) eingestellt. Sobald ca. 150ml Plasma in die Säule eingedrungen sind, muß wegen der höheren Viskosität des Plasmas die Durchflußgeschwindigkeit nachreguliert werden.

Das chromatographierte Plasma wird zunächst in Portionen zu 100ml aufgefangen; die Prothrombinaktivität wird darin bestimmt. Sobald sie auf Werte über 40% angestiegen ist, wird alles nachfolgende Plasma in einem 2 l-Kunststoffgefäß aufgefangen; die 100ml Fraktionen mit einer Prothrombin-Aktivität unter 40% werden verworfen. Da die Ionenaustauscher-Säule nicht mehr wiederverwendet wird, muß ein "Trockenlaufen" der Säule nicht verhindert werden. Sobald das chromatographierte Plasma in das 2 l-Gefäß läuft, ist eine Überwachung bis zum Ende der Chromatographie nicht erforderlich.

Nach dem Durchlauf wird das gewonnene Mangelplasma zur gleichmäßigen Durchmischung kurz umgerührt. Anschließend wird das Mangelplasma in 2ml-Portionen zunächst bei -60°C tiefgefroren; anschließend wird das Mangelplasma bei -40°C

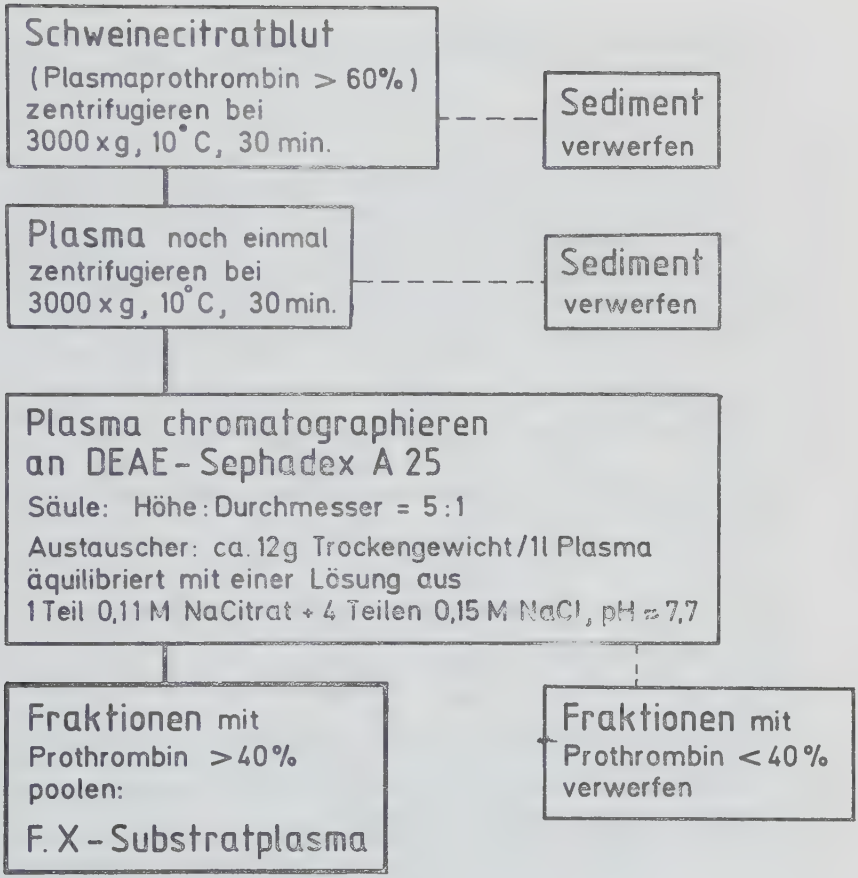


Abb. 29: Vorschrift zur Herstellung von Faktor X-Mangelplasma aus Schweinezitratplasma

gelagert.

5.5.2 Eigenschaften des Schweine-Faktor X-Mangelplasmas

5.5.2.1 Gehalt an Gerinnungsfaktoren des Extrinsic-Systems

Der Gehalt einiger Chargen des Faktor X-Mangelplasmas an Faktoren des Extrinsic Systems, die für ein spezifisches Faktor X-Mangelplasma erforderlich sind, ist in Tab. 9 angegeben. Die Aktivität des Faktors VII mußte dabei mit einer Methode unter Verwendung eines natürlichen Mangelplasmas bestimmt werden, da die KOLLER'sche Methode (150) unter Verwendung von VII/X Mangelplasma wegen der Abwesenheit von Faktor X nicht angewendet werden konnte.

Charge:	Aktivitäten in % des humanen Plasmapools				mg/100ml
	F.II	F.V	F.VII	F.X	Fbg
1)	55%	950%	120%	0%	411
13)	49%	2200%	140%	0%	384
15)	45%	1500%	140%	0%	288
16)	60%	2200%	220%	0%	254
18)	60%	2600%	260%	0%	264

Tab. 9: Faktorengehalt einiger Chargen des nach dem Routineverfahren hergestellten Schweine-Faktor X-Substratplasmas.

Wie aus der Tabelle zu erkennen ist, sind die an den Reaktionen des Extrinsic-Systems beteiligten Faktoren mit Ausnahme des Faktors X in ausreichender Konzentration vorhanden, sodaß das QUICK'sche Prinzip, das einen Überschuß aller Faktoren bis auf den zu bestimmenden (s.S. 41) fordert, bei der Verwendung dieser Substratplasmen Geltung hat.

5.5.2.2 Bestimmung der Faktor X-Restaktivität mit humanen kongenitalen Faktor X-Mangelplasmen

Die in Tab. 9 aufgeführten Faktor X-Aktivitäten waren nach der Methode von BACHMANN und Mitarb. (18) mit asbestfiltriertem Rindersubstratplasma und RVV/Phospholipid als Aktivator bestimmt worden. Diese Methode ist möglicherweise zur Bestimmung von Faktor X-Spuren in Schweinemangelplasma nicht empfindlich genug (s.S. 103). Zur Abklärung des Faktor X-Restgehalts, der als wesentlicher Parameter zur Beurteilung der Spezifität des Mangelplasmas dient, wurde die Faktor X-Aktivität des Schweinemangelplasmas mit zwei verschiedenen natürlichen humanen Mangelplasmen (Fa. Merz und Dade, Fa. Behringwerke) bestimmt. Die Bestimmung mit dem Mangelplasma der Fa. Merz und Dade erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers, sodaß die Testanordnung folgendermaßen aussah:

Teströhrchen vorwärmen bei 37°C
0,1ml Plasmaverdünnung 0,1ml Substratplasma
120" Inkubation bei 37°C
0,2ml Thromboplastin C (Dade), vorgewärmt bei 37°C

Nach der Erstellung einer Bezugskurve konnte die Faktor X-Aktivität mehrerer Chargen des Schweine-Faktor X-Mangelplasmas gemessen werden.

Wie die Tab. 10 zeigt, sind die Chargen des Schweinemangelplasmas trotz der geringfügig höheren Faktor X-Restaktivitäten qualitativ vergleichbar mit den humanen Mangelplasmen, denn die Faktor X-Aktivität aller untersuchten Mangelplasmen liegt in vergleichbarer Größenordnung.

Der Testansatz für die Bestimmung der Faktor X-Aktivität mit dem Mangelplasma der Fa. Behringwerke unterschied sich nicht von dem allgemeinen Testansatz (s. Methoden). Bei der Bestimmung der Faktor X-Restaktivität in Chargen des Schweine-Faktor X-Mangelplasmas mit dem Mangelplasma der Fa. Behringwerke fanden sich ähnliche Ergebnisse wie bei der Bestimmung mit dem Mangelplasma der

Fa. Merz und Dade.

Mangelplasma:		Faktor X in % der Aktivität eines humanen Normalplasmapools:
Schweinemangelplasma		
	Charge 1	2,4%
	13	2,4%
	16	2,6%
humanes kongenitales Mangelplasma		
Fa. Merz und Dade	Charge CF-10-22	1,8%
Fa. Behringwerke	Charge 18572	1,5%

Tab. 10: Faktor X-Restaktivität in humanen kongenitalen Mangelplasmen und in Chargen des Schweinemangelplasmas.

Die Faktor X-Aktivitäten in den humanen Mangelplasmen wurden unter Verwendung der Charge 13 des Schweinemangelplasmas bestimmt, die Faktor X-Aktivitäten im Schweinemangelplasma unter Verwendung des Mangelplasmas der Fa. Merz und Dade.

5.5.2.3 Reproduzierbarkeit des Herstellungsverfahrens

Für die Anwendbarkeit der Methode für Routinezwecke ist die gleichbleibende Qualität der Mangelplasmachargen von ausschlaggebender Bedeutung. Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit wurde das Verhalten der Gerinnungsfaktoren bei der Herstellung zweier Chargen sowie der Faktorengehalt und die Bezugskurven verschiedener Chargen des Schweine-Faktor X-Mangelplasmas miteinander verglichen.

Abb. 30 zeigt die Aktivität der Gerinnungsfaktoren in den Fraktionen des chromatographierten Schweineplasmas bei der Herstellung von 2 Chargen Mangelplasma a) und b). Die vergleichbaren Aktivitäten in den Fraktionen lassen auch einen vergleichbaren Faktorengehalt der verschiedenen Mangelplasmachargen erwarten.

Dies wird durch die in Tab. 9 zusammengestellten Aktivitätsmessungen bestätigt. Die Faktoren des Extrinsic-Systems, einschließlich Fibrinogen, sind

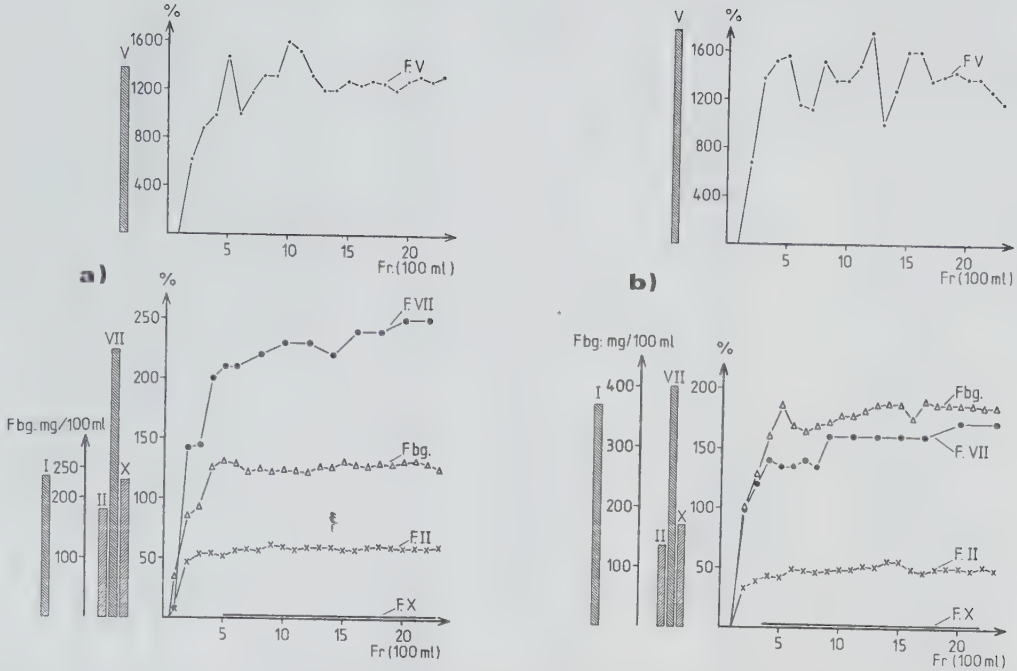


Abb. 30: Reproduzierbarkeit der präparativen Methode zur Herstellung von Faktor X-Mangelplasma aus Schweinezitratplasma:
Vergleich der Chromatographie-Diagramme zweier Präparationen a und b.
Die Säulen vor den Diagrammen geben die Aktivitäten im Ausgangsplasma an.

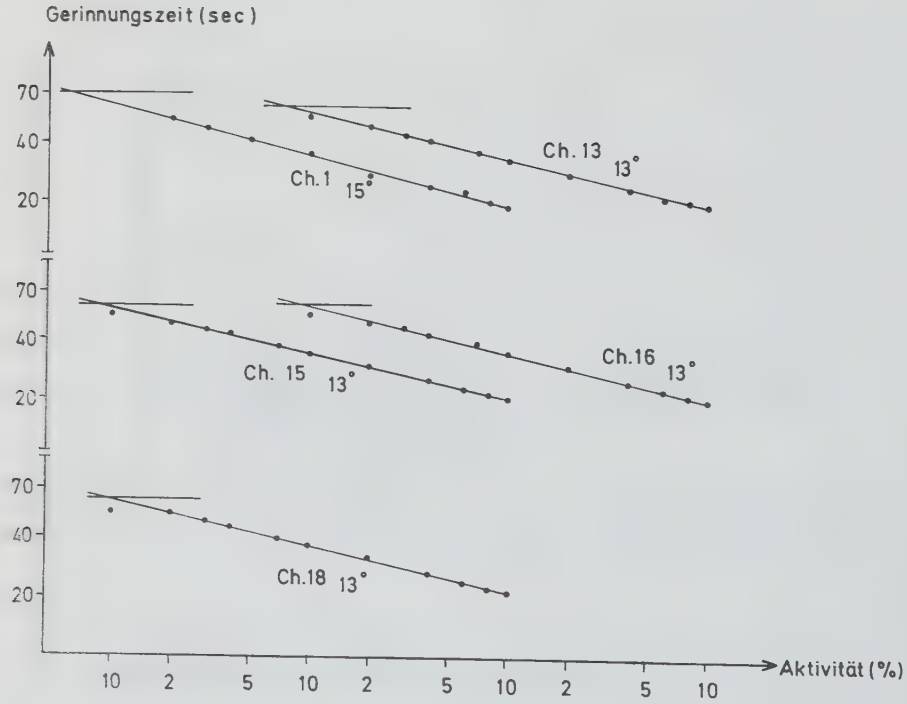


Abb. 31: Bezugskurvenvergleich zur Prüfung der Reproduzierbarkeit des Herstellungsverfahrens von artifiziellem Schweine-Faktor X-Mangelplasma:

Dazu wurden Bezugskurven der Faktor X-Schweinemangelplasma-Methode unter Verwendung der zu vergleichenden Charge erstellt; als Thromboplastin wurde Calcium-Thromboplastin Roche verwendet.

immer in teilweise sehr großem Überschuß vorhanden; Faktor X ist in keinem Mangelplasma mit der Methode von BACHMANN (18) nachweisbar.

Die Bezugskurven einiger Chargen des Faktor X-Substratplasmas sind in Abb. 31 zu sehen. Es zeigt sich eine lineare Beziehung im doppelt logarithmischen System im Bereich von 100% bis 2% - 3%. Der Neigungswinkel der Bezugskurven liegt zwischen 13^{o} und 15^{o}. Der Schnittpunkt der Bezugskurven und des Leerwertes liegt immer unter 1%. Somit zeigt sich eine gute Reproduzierbarkeit des Herstellungsverfahrens, die ihren Ausdruck sowohl in einem gleichbleibenden Faktorengehalt als auch in einer vergleichbaren Empfindlichkeit der Mangelplasmachargen findet.

5.5.3 Verwendung des Schweinesubstratplasmas für Faktor X-Einstufenmethoden

5.5.3.1 Spezifität

Für die Bestimmung der Aktivität eines Gerinnungsfaktors mit einer Einstufen-Methode ist ein Mangelplasma erforderlich, das spezifisch und mit ausreichender Empfindlichkeit auf Aktivitätsänderungen des zu bestimmenden Faktors reagiert (s.S.42).

Mit der Bestimmung der Aktivität der Faktoren des Extrinsic Systems (s. Tab. 9) und der Bestimmung der Restaktivität des Faktors X im Schweine-Faktor X-Mangelplasma mit Methoden unter Verwendung von natürlichen humanen Mangelplasmen (s. Tab. 10) konnte die Spezifität des artifiziellen Schweinemangelplasmas nachgewiesen werden: Bei sehr geringer Restaktivität an Faktor X enthalten die Chargen des Schweinemangelplasmas die übrigen für den Reaktionsablauf des Extrinsic-Systems erforderlichen Faktoren in ausreichender Aktivität, sodaß bei der Verwendung dieses Mangelplasmas zur Bestimmung der Faktor X-Aktivität die Anforderungen, die QUICK an eine spezifische Einstufen-Methode stellte, erfüllt sind.

5.5.3.2 Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen der Faktor X-Aktivität

Ein Maß für die Empfindlichkeit eines Mangelplasmas gegenüber Aktivitätsänderungen, die unter anderem auch noch von der im Mangelplasma enthaltenen Restaktivität des zu bestimmenden Faktors abhängt, ist die Linearität der Bezugskurve im doppelt logarithmischen System sowie der Neigungswinkel dieser Kurve. Der Vergleich der Bezugskurve der Methode unter Verwendung eines humanen kongenitalen Mangelplasmas mit der Bezugskurve der Methode unter Verwendung einer Charge des Schweinemangelplasmas (Abb. 32) zeigt eine gleich hohe Empfindlichkeit des humanen Faktor X-Mangelplasmas und des Schweineplasmas gegenüber Veränderungen der Aktivität des humanen Faktors X in den Normalplasma-Verdünnungen. Wegen der besonderen Faktor X-Empfindlichkeit (s.S. 31) wurde für die Faktor X-Bestimmungen mit dem Schweinesubstratplasma ein Lungenthromboplastin-Präparat zur Aktivierung des Extrinsic-Systems benutzt. Über die Unterschiede der Empfindlichkeit, die sich bei der Verwendung anderer Thromboplastin-Präparate ergaben, wird im folgenden Abschnitt (5.5.3.3) berichtet.

Eine weitere Möglichkeit, über Spezifität und Empfindlichkeit Aufschluß zu erhalten, ist ein Vergleich der Faktor X-Aktivität in verschiedenen Plasmen, die parallel mit der Schweinesubstratplasmamethode und anderen spezifischen Faktor X-Einstufen-Methoden gemessen wurden. Die Ergebnisse eines solchen Vergleichs sind im letzten Abschnitt (5.5.3.5) beschrieben.

5.5.3.3 Einfluß verschiedener thromboplastischer Aktivatoren

Bei allen Bestimmungen der Faktor X-Aktivität mit dem Schweinesubstratplasma, die in den vorausgegangenen Abschnitten erwähnt wurden, war als Aktivator des Reaktionsablaufs des Extrinsic-Systems ein Lungenthromboplastin-Präparat (Calcium-Thromboplastin Roche) verwendet worden, weil sich Thromboplastin-Präparate aus Lungengewebe als besonders empfindlich gegenüber Aktivitätsänderungen des Faktors X gezeigt hatten (s.S. 31). Nun sollte die Empfindlichkeit der Schweine-Mangelplasma-Methode gegenüber Aktivitätsänderungen des Faktors X bei der Verwendung von Thromboplastin-Präparaten aus anderen Geweben und Spezies untersucht werden. Als Kriterien für die Empfindlichkeit der Thromboplastine galten der Neigungswinkel und die Linearität der Bezugskurven im doppelt logarithmischen Koordinatensystem, die mit der Schweinesubstratplasma-Methode un-

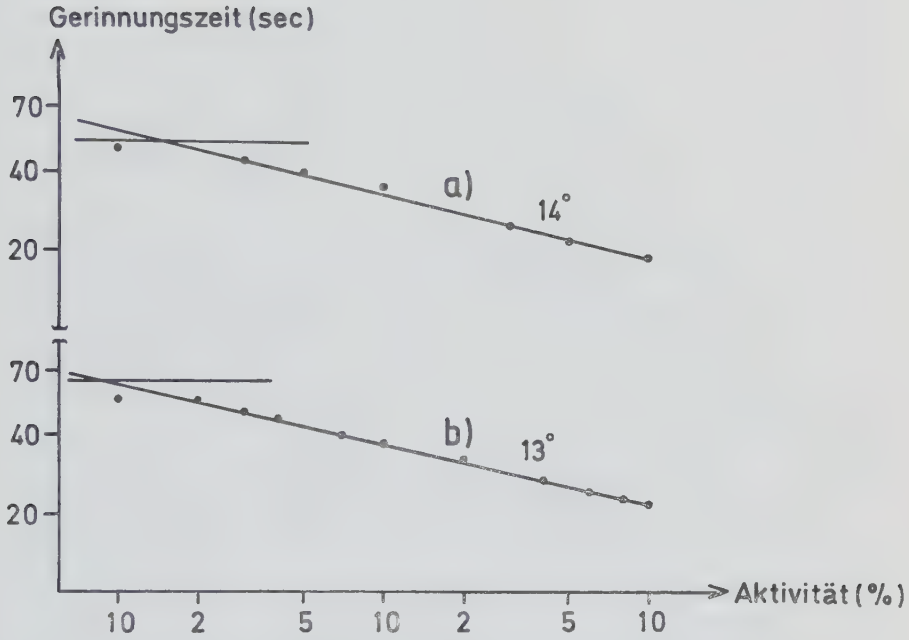


Abb. 32: Vergleich der Empfindlichkeit gegenüber Faktor X-Aktivitätsänderungen der Schweinemangelplasma-Methode mit einer Methode unter Verwendung eines humanen kongenitalen Mangelplasmas

Dazu wurden die Bezugskurven einer Methode unter Verwendung eines natürlichen Mangelplasmas (Fa. Merz und Dade, Charge CF-10-22, Kurve a) und des artifiziellen Faktor X-Schweinemangelplasmas (Charge 13, Kurve b) miteinander verglichen.
Bei der Verwendung des humanen Mangelplasmas wurde nach Vorschrift des Herstellers Thromboplastin C Dade als Aktivator verwendet, bei der Verwendung des Schweinemangelplasmas Calcium-Thromboplastin Roche.

ter Verwendung des jeweiligen Thromboplastinpräparates erstellt werden konnte. Die Thromboplastine, bei deren Verwendung die Bezugskurven eine ausreichende Steilheit sowie Linearität bis in den Bereich einer Faktor X-Aktivität von <5% aufwiesen, wurden als geeignet angesehen. Unter Verwendung folgender Thromboplastine wurden Bezugskurven erstellt: British Comperative Thromboplastin (menschliches Hirn), Calcium-Thromboplastin Boehringer (Affenhirn), Calcium-Thromboplastin Roche (Kaninchenlunge), Simplastin, Simplastin Automated (Kaninchenhirn und -lunge), Thromboplastin C Dade (Kaninchenhirn).

Zur Durchführung der Bestimmungen wurden sowohl die manuelle Häkchentechnik als auch ein automatisches Koagulometer (Auto-Fi, Fa. Dade) eingesetzt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 33 und 34 dargestellt. Daraus ist zu ersehen, daß für die Faktor X-Bestimmungsmethode mit dem Schweinesubstratplasma fast jedes der untersuchten Thromboplastinpräparate eingesetzt werden kann. Bei der Verwendung der Präparate British Comperative Thromboplastin und Calcium-Thromboplastin Boehringer, die beide aus Hirngewebe hergestellt werden (s.o.), zeigten sich allerdings weniger gute Ergebnisse: Die Bezugskurven sind sowohl bei Anwendung der manuellen Methode als auch bei Anwendung des "Auto-Fi" nur bis in einen Aktivitätsbereich von etwa 10% linear, während die Kurven bei Verwendung der anderen Präparate bis in einen Bereich von 2% - 5% linear sind.

Von allen getesteten Thromboplastinpräparaten erwies sich Calcium-Thromboplastin Roche als am besten geeignet, wie Neigungswinkel und Linearität der Bezugskurven zeigen. Dies gilt sowohl bei der Anwendung der Häkchentechnik als auch des "Auto-Fi". Mit der manuellen Technik werden geringfügig bessere Ergebnisse erzielt als mit dem "Auto-Fi": Die Bezugskurven sind bei der Verwendung von Calcium-Thromboplastin Roche mit der manuellen Methode im doppelt logarithmischen System von 100% - 2% linear, mit dem "Auto-Fi" nur bis 5%.

Es besteht die Möglichkeit, den Faktor X, der physiologischerweise durch das Extrinsic und das Intrinsic System aktiviert werden kann, zusätzlich auch durch RVV in Verbindung mit Phospholipiden zu aktivieren (s.S. 36). Die Möglichkeit, Faktor X-Bestimmungen mit dem Schweinesubstratplasma unter Verwendung von RVV/Phospholipid als Aktivator anstelle von Gewebsthromboplastin durchzuführen, wurde untersucht. Dazu wurde eine Bezugskurve erstellt. Der Testansatz sah folgendermaßen aus:

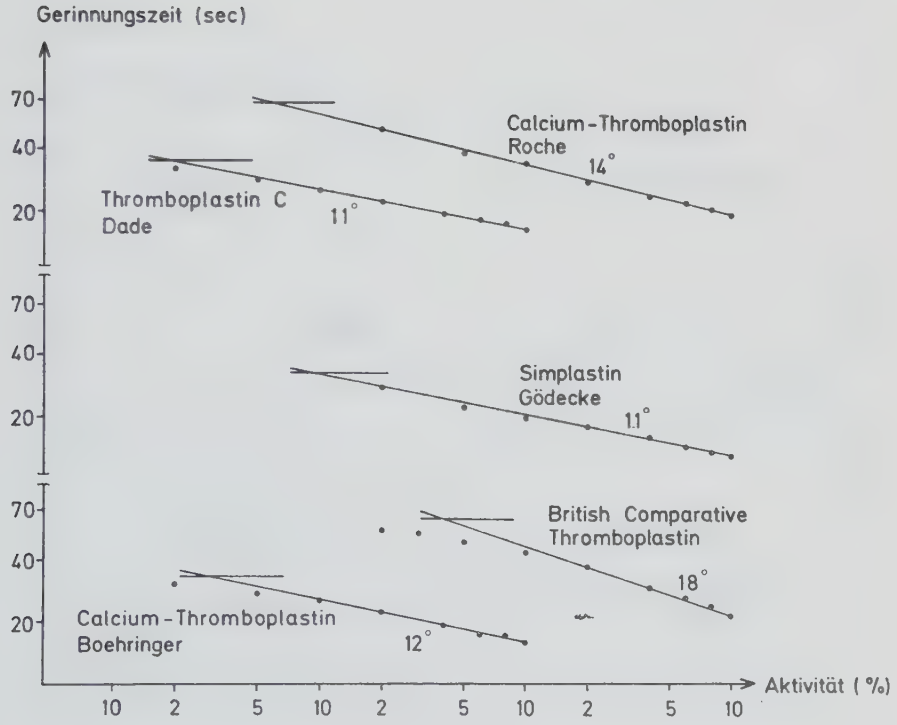


Abb. 33: Bezugskurvenvergleich von Faktor X-Schweinesubstratplasma-Methoden unter Verwendung verschiedener Thromboplastin-Präparate. Die Bestimmungen wurden manuell durchgeführt.

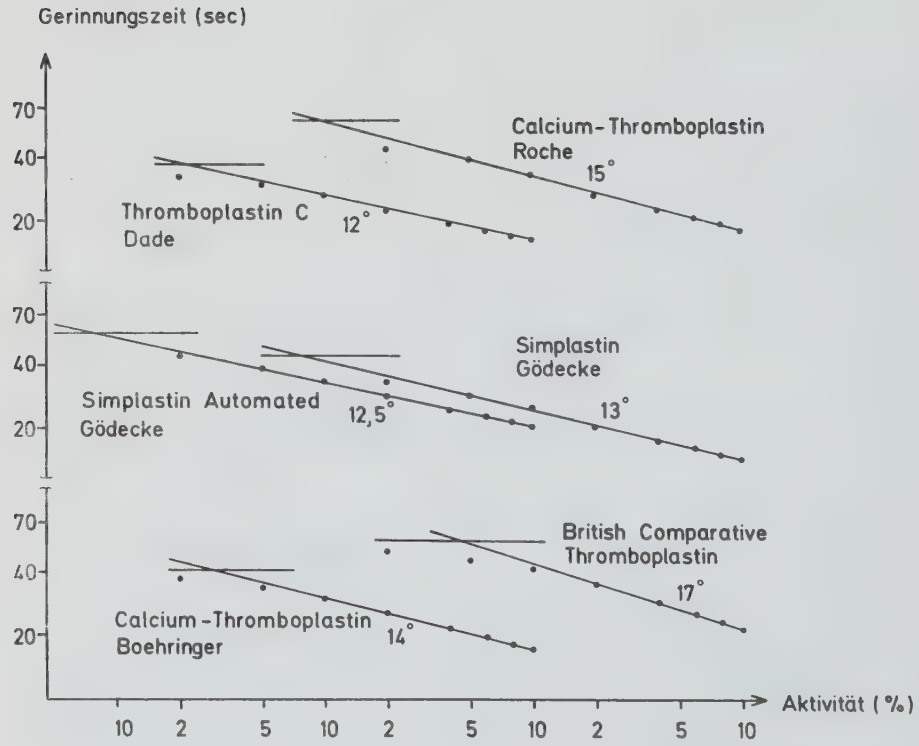


Abb. 34: Bezugskurvenvergleich von Faktor X-Schweinesubstratplasma-Methoden unter Verwendung verschiedener Thromboplastin-Präparate

Die Bestimmungen wurden mit dem Gerinnungsautomaten "Auto-Fi" durchgeführt.

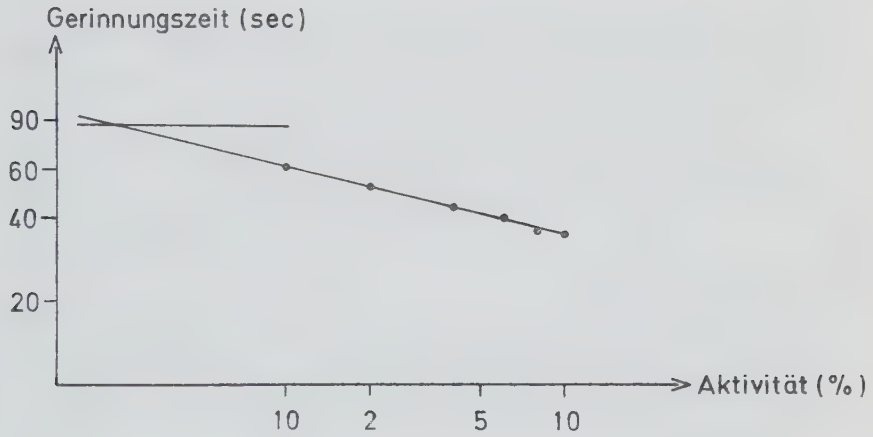


Abb. 35: Bezugskurve der Faktor X-Schweinesubstratplasma-Methode unter Verwendung von Stypven/Phospholipid als thromboplastischem Aktivator

0,1ml Plasmaverdünnung
0,1ml Schweinesubstratplasma
0,1ml Phospholipid/Stypven-Lösung

30" Inkubation bei 37°C

0,1ml 0,025 M $CaCl_2$-Lösung

Eine über einen größeren Aktivitätsbereich lineare Bezugskurve ließ sich nur erstellen, wenn die Aktivität eines 20-fach verdünnten Plasmapools gleich 100% gesetzt wurde. Eine solche Bezugskurve ist in Abb. 35 gezeigt. Die Bezugskurve ist im Aktivitätsbereich von 100% bis 10% linear.

Ein Nachteil ist die Instabilität des Testsystems: Bei der Bestimmung des 100%-Wertes verlängerte sich die Gerinnungszeit innerhalb von 45 min um 2 Sekunden. Da ein solches Verhalten bei der Verwendung von Thromboplastin-Präparaten nicht beobachtet wurde (s. auch S. 130), muß diese Instabilität durch das Stypven bedingt sein.

Da Faktor X in vivo auch über das Intrinsic System aktiviert wird, war es interessant zu sehen, ob eine Bestimmung der Faktor X-Aktivität mit dem Schweinesubstratplasma auch möglich ist, wenn der Faktor X dabei über das Intrinsic System aktiviert wird. In einigen orientierenden Versuchen, bei denen der Reaktionsablauf des Intrinsic Systems durch Kaolin und Phospholipide in verschiedener Konzentration sowie durch die Präparate Aktin und Cephaloplastin gestartet wurde, zeigte sich eine sehr geringe Empfindlichkeit des Schweinesubstratplasmas gegenüber Aktivitätsänderungen des Faktors X.

5.5.3.4 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Faktor X-Schweinesubstratplasma-Methode

5.5.3.4.1 Mehrfachbestimmungen im Plasma

Die Faktor X-Aktivität eines humanen Normalplasmas wurde mit der Schweinesubstratplasma-Methode unter Verwendung von Calcium-Thromboplastin Roche 100 mal bestimmt. Die Bestimmungen wurden mit dem "Auto-Fi" durchgeführt.
Die Standardabweichung betrug 0,25 Sekunden, der Variationskoeffizient 1,2%.

5.5.3.4.2 Lagerungsstabilität des Mangelplasmas bei -40°C

Von praktischer Bedeutung ist die Stabilität des Reagenz bei der Lagerung. Zur Überprüfung dieser Stabilität wurden Bezugskurven von mehreren Chargen des Schweinesubstratplasmas, das bei -40°C tiefgefroren gelagert wurde, im Abstand von einigen Wochen erstellt. Folgende Thromboplastinpräparate wurden dabei verwendet: Calcium-Thromboplastin Roche, Thromboplastin C Dade, Simplastin Automated, Calcium-Thromboplastin Boehringer. Die Bestimmungen wurden manuell und unter Verwendung des "Auto-Fi" durchgeführt. In Abb. 36 und 37 sind Beispiele dieser Stabilitätsprüfung dargestellt. Sie zeigen die Bezugskurven einer Charge des Substratplasmas, die unter Verwendung des "Auto-Fi" mit Calcium-Thromboplastin Roche (Abb. 36) und mit Simplastin Automated (Abb. 37) im Verlauf von 6 - 11 Monaten erstellt wurden. Wie daraus zu erkennen ist, änderten sich innerhalb des angegebenen Zeitraumes weder Neigungswinkel noch Linearität der Bezugskurven.

In gleicher Weise wurden weitere Chargen des Schweinesubstratplasmas unter Verwendung der oben erwähnten Thromboplastinpräparate auf ihre Stabilität geprüft. Die Bestimmungen wurden sowohl manuell als auch mit Hilfe des "Auto-Fi" durchgeführt. Auch hierbei blieben Neigungswinkel und Linearität der Bezugskurven über 2 - 4 Monate innerhalb enger Grenzen konstant.

5.5.3.4.3 Stabilität des tiefgefrorenen Mangelplasmas nach dem Wiederauftauen

Von gleich wichtiger praktischer Bedeutung wie die Lagerungsstabilität des Substratplasmas ist die Stabilität des Testsystems in dem Zeitraum, der für die Durchführung der Bestimmungen erforderlich ist. Diese Form der Stabilität ist abhängig von der Stabilität des Substratplasmas und der des thromboplastischen Aktivators.
Bei der Verwendung von Stypven/Phospholipid zur Aktivierung des Extrinsic Systems blieb das Testsystem, wie bereits erwähnt,nicht stabil (s.S. 126).

Nach den Erfahrungen, die bei der Faktor X-Bestimmung mit dem Schweinesubstratplasma unter Verwendung von Thromboplastin-Präparaten gemacht wurden, war zu vermuten, daß die Stabilität des Testsystems größer ist als bei der Verwendung von Stypven.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die Faktor X-Aktivität eines humanen

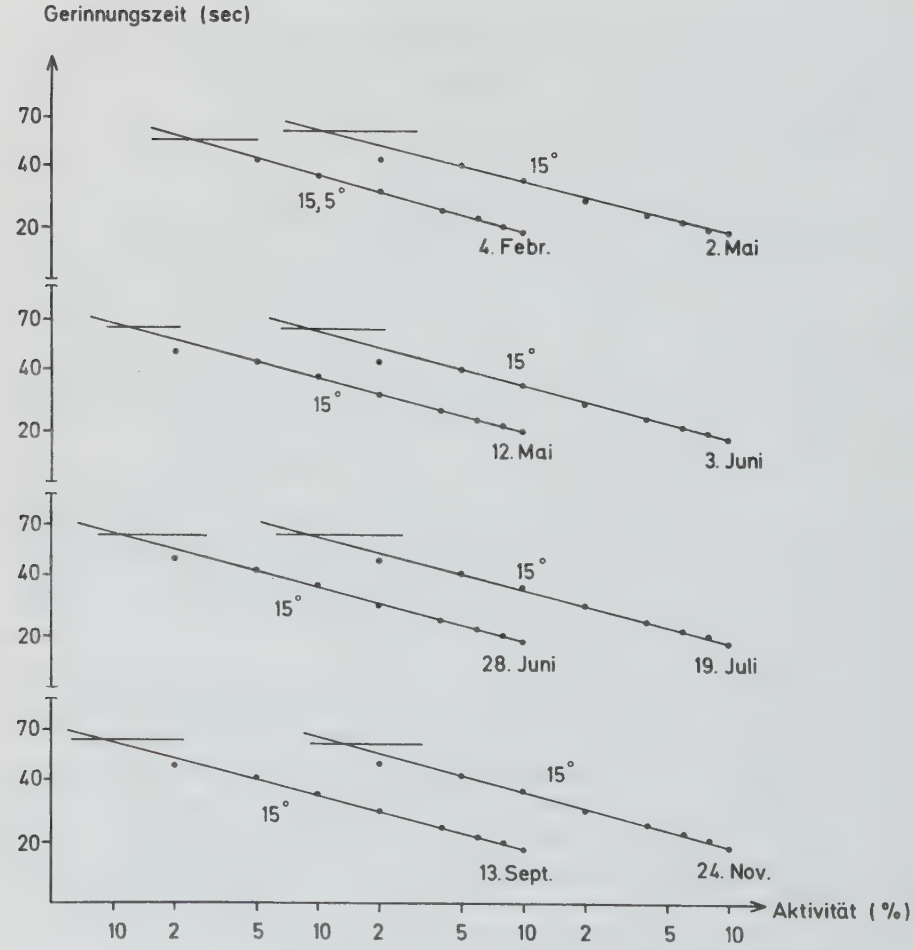


Abb. 36: Stabilitätsprüfung des Faktor X-Schweinesubstratplasmas anhand von Bezugskurven, die über einen Zeitraum von fast 11 Monaten unter Verwendung von Calcium-Thromboplastin Roche angefertigt wurden. Die Bestimmungen wurden mit dem "Auto-Fi" durchgeführt.

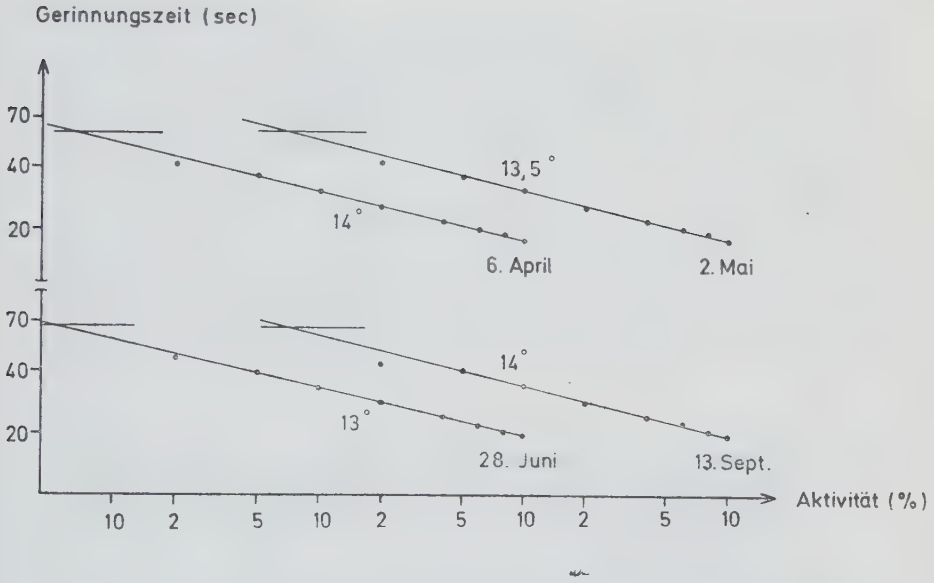


Abb. 37: Stabilitätsprüfung des Faktor X-Schweinesubstratplasmas anhand von Bezugskurven, die unter Verwendung des Thromboplastinpräparates Simplastin Automated über einen Zeitraum von 6 Monaten angefertigt wurden. Die Bestimmungen wurden mit dem "Auto-Fi" durchgeführt.

Normalplasmapools (100%-Wert) mit der Schweinesubstratplasma-Methode unter Verwendung von Calcium-Thromboplastin Roche in einem Zeitraum von über 4 Stunden wiederholt bestimmt; der Pufferleerwert wurde ebenfalls mit denselben Reagenzien bestimmt. Dabei zeigte sich (Abb. 38a), daß die Reaktionszeit des 100%-Wertes über einen Zeitraum von über 4 Stunden konstant blieb; die Reaktionszeit des Pufferleerwertes nahm innerhalb dieses Zeitraumes um ca. 8 Sekunden ab.

In einem weiteren Versuch wurde eine Bezugskurve unter Verwendung des Mangelplasmas und Calcium-Thromboplastin Roche 30 Minuten nach dem Auftauen angefertigt, eine zweite Kurve 6 Stunden nach dem Wiederauftauen. Wie Abb. 38b zeigt, änderte sich in diesem Zeitraum weder Neigungswinkel noch Linearität der Bezugskurven; lediglich die Reaktionszeit des Pufferleerwertes wurde um 8 Sekunden kürzer.

Die Ergebnisse der beiden Versuche lassen auf eine ausgezeichnete Stabilität des Testsystems (Thromboplastinpräparat und Mangelplasma) schließen; die Verminderung der Reaktionszeit des Pufferleerwertes hat nur eine Verminderung der Empfindlichkeit der Methode gegenüber Faktor X-Aktivitätsänderungen im Bereich von unter 1% zur Folge.

5.5.3.5 Vergleichende Bestimmung der Faktor X-Aktivität in Patientenplasmen unter Verwendung von Schweinemangel-, Rindermangel- und humanem kongenitalen Mangelplasma

Die Faktor X-Aktivität in den Plasmen verschiedener Probanden wurde parallel mit der Schweinesubstratplasma-Methode und mit anderen Methoden bestimmt, um die Ergebnisse dieser neuen Methode mit schon bestehenden Methoden zu vergleichen. Als Vergleichs-Methoden dienten dabei die Methode von BACHMANN und Mitarb. (18) unter Verwendung des Rindermangelplasmas und Phospholipid-Stypven als thromboplastischem Aktivator sowie eine Methode unter Verwendung eines humanen kongenitalen Mangelplasmas der Fa. Merz und Dade (s. Methoden). Der Vergleich sollte in einem breiten Aktivitätsbereich und bei verschiedenartigen Gerinnungsstörungen durchgeführt werden. Deshalb wurde die Faktor X-Aktivität im Plasma folgender Probandengruppen bestimmt:

1) Patienten, bei denen zur Abklärung von Gerinnungsstörungen die Faktor X-Aktivität bestimmt wurde,

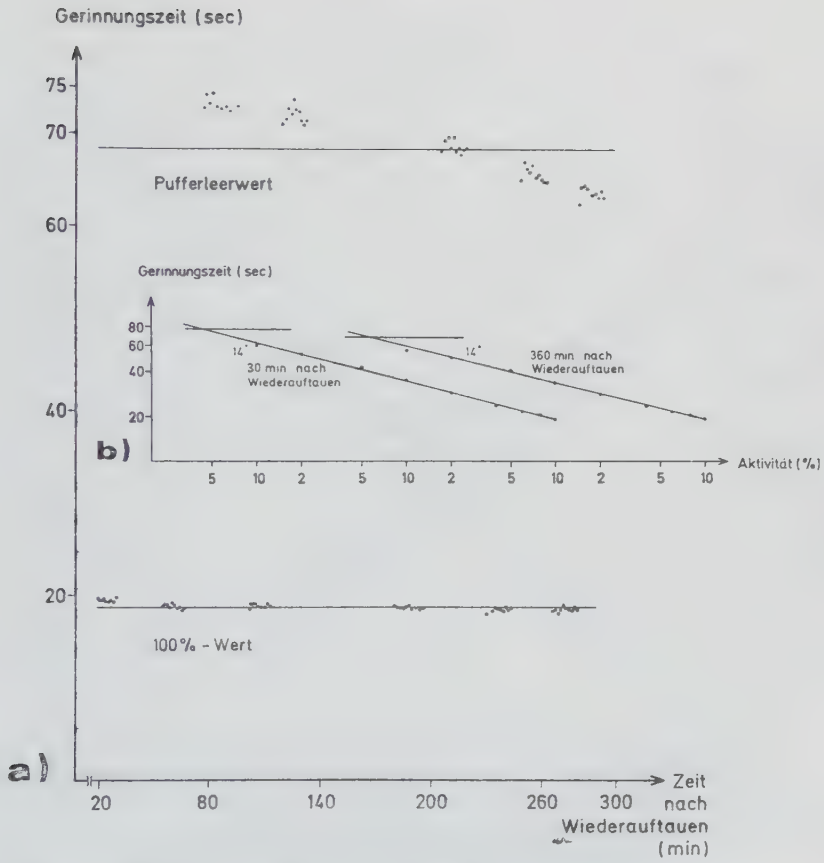


Abb. 38: Stabilitätsprüfung des bei -40°C gelagerten Schweine-Faktor X-Mangelplasmas

a) anhand von Faktor X-Bestimmungen, die im Zeitraum von 4 1/2 Stunden nach dem Wiederauftauen des Mangelplasmas durchgeführt wurden; die dabei erhaltenen Gerinnungszeiten wurden gegen die Zeit aufgetragen, der Mittelwert als Waagerechte eingezeichnet. Es wurden jeweils der 100%-Wert und der Pufferleerwert 10-fach bestimmt

b) anhand von Bezugskurven, die im Abstand von 1/2 bis 6 Stunden nach Wiederauftauen angefertigt wurden.

Die Bestimmungen wurden mit dem "Auto-Fi" durchgeführt, als Thromboplastinpräparat wurde Calcium-Thromboplastin Roche verwendet.

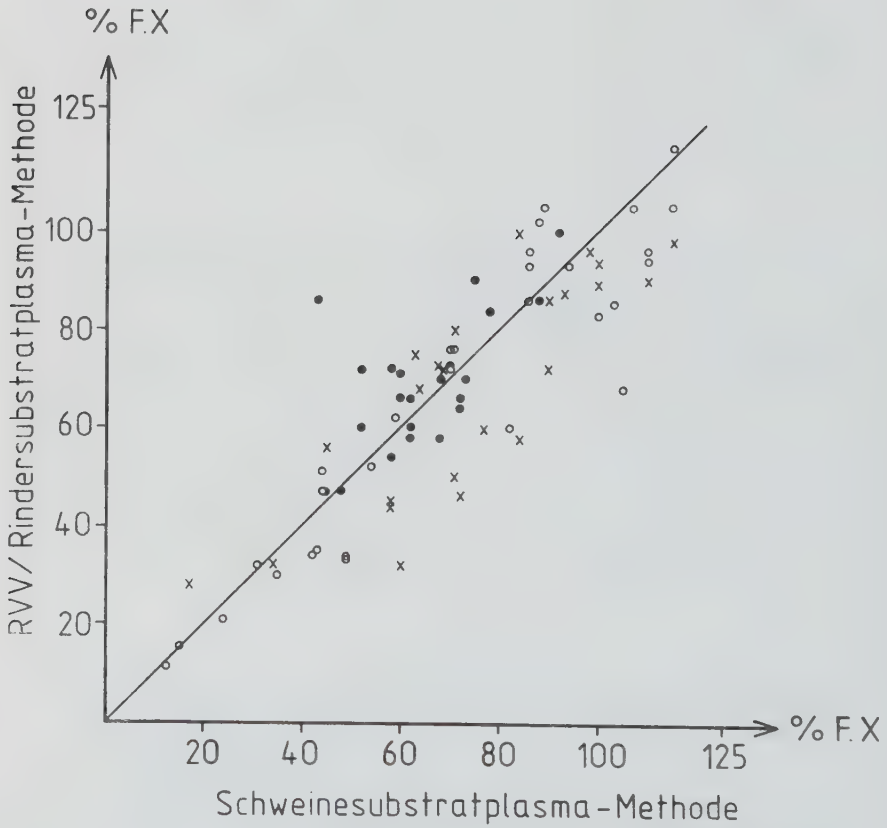


Abb. 39: Vergleich der Schweineplasma-Methode mit der RVV/Rinderplasma-Methode (BACHMANN und Mitarb., 18):

Die Faktor X-Aktivität in den Plasmen folgender Probandengruppen wurde bestimmt:

- ▫ Patienten, bei denen zur Abklärung von Gerinnungsstörungen die Faktor X-Aktivität bestimmt wurde
- ● Patienten mit Leberzirrhose
- x Patienten unter Heparintherapie

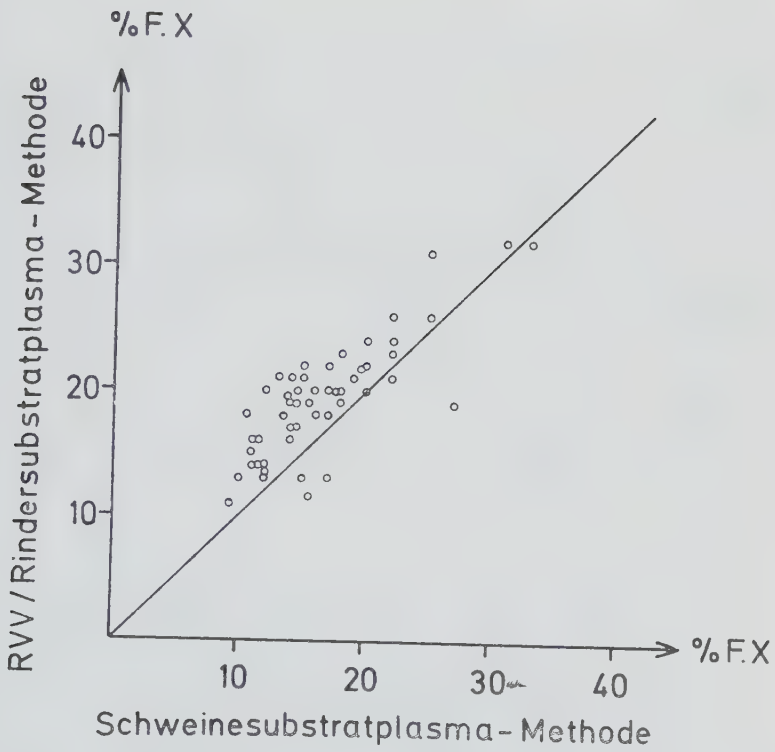


Abb. 40: Vergleich der Schweineplasma-Methode mit der RVV/Rinderplasma-Methode (BACHMANN und Mitarb., 18):

Die Faktor X-Aktivität in den Plasmen von Patienten unter Marcumar-Therapie wurde bestimmt.

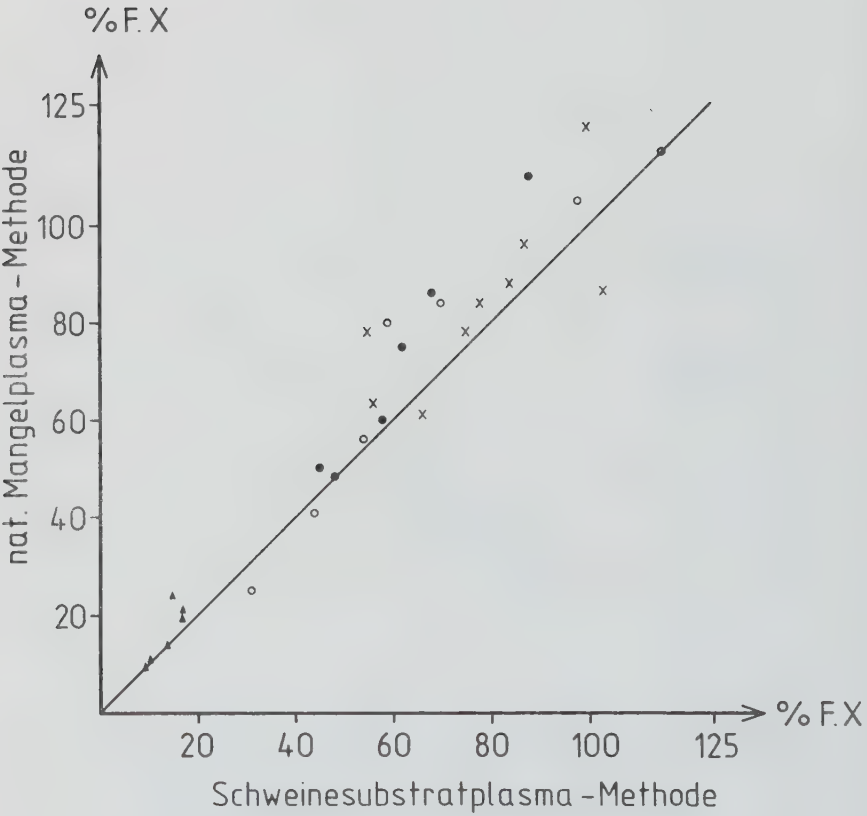


Abb. 41: Vergleich der Schweineplasma-Methode mit einer Methode unter Verwendung eines humanen kongenitalen Mangelplasmas

Die Faktor X-Aktivität in den Plasmen folgender Probandengruppen wurde bestimmt:

- o Patienten, bei denen zur Abklärung von Gerinnungsstörungen die Faktor X-Aktivität bestimmt wurde
- ● Patienten mit Leberzirrhose
- x Patienten unter hochdosierter Heparintherapie
- ▲ Patienten unter Marcumartherapie

2) Patienten mit Leberzirrhose verschiedener Ätiologie,
3) heparinisierte Patienten (20 000 - 30 000 E/24h),
4) Patienten, die mit einem Vitamin K-Antagonisten (Marcumar®) behandelt wurden.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 39 - 41 dargestellt. Die Aktivität des Faktors X in den Plasmen der in den oben erwähnten Gruppen zusammengefaßten Patienten ist durch verschiedene Symbole gekennzeichnet. Die Lage der Symbole auf der Abszisse gibt die Faktor X-Aktivitäten an, die mit der Schweinesubstratplasmamethode erhalten wurden, die Lage der Symbole auf der Ordinate die Aktivitäten, die mit einer der beiden anderen Methoden gefunden wurden. Die miteingezeichnete Gerade liegt im Winkel von 45^{o} zu Abszisse und Ordinate; sie gibt die Linie an, auf der alle Punkte liegen müßten, wenn alle Aktivitäten exakt übereinstimmten. Die Werte zeigen eine ausreichende Übereinstimmung sowohl zwischen Schweineplasma- und der RVV-Phospholipid-Rinderplasma-Methode als auch der Schweineplasma-Methode und der Methode unter Verwendung des kongenitalen humanen Mangelplasmas.

Die Schweineplasma-Methode gibt bei den Patienten unter Marcumar-Therapie etwas niedrigere Werte an als die RVV-Rindersubstratplasma-Methode.

6 Besprechung der Ergebnisse

Zur Bestimmung der Aktivität von Gerinnungsfaktoren im Einstufen-Test benötigt man ein spezifisches Mangelplasma. Dazu kann das Plasma eines Patienten mit einem angeborenen Mangel eines Gerinnungsfaktors verwendet werden. Wegen der Seltenheit angeborener Defekte der Gerinnungsfaktoren (281), insbesondere von Homozygoten der autosomal vererbbaren Defekte, stehen solche "natürlichen" Mangelplasmen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung. Man ist daher auf artifizielle Mangelplasmen angewiesen. Bei der Herstellung derartiger Mangelplasmen kommen verschiedene Methoden zur Anwendung, unter denen die Adsorption von Gerinnungsfaktoren an anorganische Adsorbentien (z.B. Asbestfilter, $BaSO_4$), die Inaktivierung eines Gerinnungsfaktors, die Trennung der Gerinnungsfaktoren durch chromatographische Methoden und die anschließende teilweise Rekombination von dabei entstehenden Plasmafraktionen zu einem Mangelplasma sowie die Adsorption eines Gerinnungsfaktors mit einem spezifischen Antikörper zu nennen sind.

Zur Herstellung eines artifiziellen Mangelplasmas muß jeweils ein einzelner Gerinnungsfaktor vollständig aus dem Plasma entfernt werden. Im Fall der Vitamin K-abhängigen Faktoren wird eine derartige Trennung durch die Ähnlichkeit der physikochemischen Eigenschaften sehr erschwert (s. Abschnitt 3.1.1).

Bei der Bestimmung der Aktivität menschlicher Gerinnungsfaktoren ist in erster Linie an Humanplasma als Ausgangsmaterial für die Präparation von Mangelplasmen zu denken. Andererseits ist die Verwendung von Plasmen anderer Säugetierspezies ebenfalls möglich, da die Gerinnungsfaktoren im Gerinnungssystem der Säugetiere offensichtlich die gleiche, nicht Spezies-gebundene Funktion haben (9). Die Vitamin K-abhängigen Faktoren verschiedener Spezies zeigen ein unterschiedliches physikochemisches Verhalten, wie auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen (s. Abschnitt 5.2.6). Die Unterschiede des physikochemischen Verhaltens lassen bei bestimmten Spezies die Trennung von Gerinnungsfaktoren zu, sodaß die Präparation eines Mangelplasmas möglich ist, während mit derselben Versuchsanordnung die Trennung der Gerinnungsfaktoren anderer Spezies nicht möglich ist. Ein Beispiel hierfür ist die Entfernung des Faktor VII/X-Komplexes durch Adsorption an Asbestfilter aus bovinem Oxalatplasma. Unter Verwendung des Faktor VII/X-freien Filtrats als Mangelplasma und RVV-Phospholipid als thromboplastischem Aktivator kann eine spezifische Faktor X-Bestimmung durchgeführt werden (s. Tab. 3). Die selektive Entfernung der Faktoren VII und X aus humanem oder aus Schweineoxalatplasma

ist bei gleicher Versuchsanordnung nicht möglich (150 und S. 82).

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Möglichkeiten zur selektiven Entfernung der Vitamin K-abhängigen Faktoren aus den Plasmen verschiedener Säugetierspezies vorwiegend mit Hilfe der Ionenaustauscher-Chromatographie und der anschließenden Rekombination von dabei entstehenden Plasmafraktionen zu einem spezifischen Faktor II-, Faktor VII- und Faktor X-Mangelplasma gesucht. Aus Gründen der Praktikabilität wurde in diese Untersuchungen nur das Plasma solcher Spezies einbezogen, deren Blut ohne Schwierigkeiten in großen Mengen zu beschaffen ist, nämlich Humanplasma (Blutspender) und Plasma von Schafen, Pferden, Rindern und Schweinen.

Ausgangspunkt dieser Untersuchungen waren die Arbeiten von CASILLAS und Mitarb. (36), LECHNER und DEUTSCH (161) und von HEMKER und Mitarb. (123). Sie konnten Bedingungen angeben, unter denen die Faktoren II und X aus humanem Zitratplasma an eine DEAE-Cellulose-Säule gebunden wurden, der Faktor VII dagegen die Säule unadsorbiert passierte. Die Faktoren II und X konnten dann eluiert und mit $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma zu einem spezifisch auf Faktor VII-Aktivität reagierenden Mangelplasma rekombiniert werden.

Bei dem Versuch, die Arbeiten von LECHNER und DEUTSCH sowie von HEMKER und Mitarb. zu reproduzieren, fielen die stark differierenden Ergebnisse bei der Bestimmung der Aktivität des Faktors VII im Eluat mit der Methode von KOLLER und Mitarb. (150) unter Verwendung des Faktor VII/X-Mangelplasmas einerseits und mit einer Methode unter Verwendung eines humanen kongenitalen Mangelplasmas andererseits auf. Als Ursache dieser Unterschiede wurde zunächst vermutet, daß die Methode von KOLLER und Mitarb. (150) andere Aktivitäten angibt, wenn der Faktor VII im Gegensatz zum Faktor X sehr viel stärker vermindert ist als wenn die Faktoren VII und X gleichmäßig vermindert sind.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Bezugskurven unter Verwendung des Faktor VII/X-Mangelplasmas und RVV-Phospholipid als thromboplastischem Aktivator erstellt, wobei einmal der Humanplasmapool in üblicher Weise mit Michalis-Puffer verdünnt wurde, ein zweites Mal die Verdünnung des Humanplasmapools mit einem kongenitalen humanen Faktor VII-Mangelplasma erfolgte, welches ungefähr dieselbe Faktor X-Aktivität aufwies wie der Humanplasmapool (Abb. 3). Damit sollte erreicht werden, daß die Faktor VII-Aktivität in den Verdünnungen bei gleichbleibender Faktor X-Aktivität abnimmt. Ein Vergleich dieser beiden Bezugskurven zeigte einen deutlich niedrigen Steigungswinkel der zweiten Bezugskurve; darüberhinaus war sie nur bis in einen Aktivitätsbereich von

40% linear und zeigte im Bereich unter 40% einen immer kleiner werdenden Neigungswinkel. Damit schienen die Unterschiede bei der Bestimmung der Faktor VII-Aktivität mit der Methode unter Verwendung des natürlichen Mangelplasmas und mit der Methode von KOLLER und Mitarb. (150) auf den ersten Blick geklärt: Bei einer im Vergleich zur Aktivität des Faktor VII hohen Faktor X-Aktivität wird die Faktor VII-Aktivität mit der KOLLER'schen Methode zu hoch angegeben, wenn die Berechnung der Faktor VII-Aktivität aufgrund der steileren Bezugskurve erfolgt.

Diese Erklärung kann jedoch nur zum Teil befriedigen. Zum einen kann die Abflachung der zweiten Bezugskurve sowohl durch den Faktor X als auch durch die Faktor VII-Restaktivität des humanen kongenitalen Mangelplasmas bedingt sein, zum anderen gab die Methode nach KOLLER und Mitarb. auch dann höhere Aktivitäten an, wenn die Berechnung der Aktivitäten aufgrund der flacheren Bezugskurve (Abb. 3, Kurve a) erfolgte.

Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auch durch eine höhere Empfindlichkeit des asbestfiltrierten Mangelplasmas auf aktivierte Formen der Faktoren VII und X erklärt werden. Eine Aktivierung der Faktoren des Prothrombinkomplexes während der Chromatographie an DEAE-Ionenaustauschern ist von mehreren Untersuchern (277, 10, 233) beschrieben worden. Da sich diese Aktivierung in Gegenwart von Enzyminhibitoren (z.B. Benzamidin, DFP, SBTI) verhindern läßt (10, 45, 233), erfolgt bei den meisten neueren Methoden zur Reindarstellung der Faktoren II, VII und X die Chromatographie an DEAE-Ionenaustauschern in Gegenwart von Enzyminhibitoren (20, 45, 78, 149, 184, 216, 233).

Enzyminhibitoren wurden in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet. Daher ist die Anwesenheit von aktivierten Faktoren in den durch Elution von DEAE-Ionenaustauschern gewonnenen Plasmafraktionen nicht auszuschließen.

Auch wenn die Faktor VII-Aktivität mit der Methode unter Verwendung eines natürlichen Mangelplasmas gemessen wurde und nicht mit der Methode von KOLLER und Mitarb., konnte die Trennung des Faktors VII von den Faktoren II und X nicht ganz erreicht werden: Das aus der durch Elution von DEAE-Cellulose gewonnenen Plasmafraktion hergestellte Mangelplasma (s.S. 87) wies mit 7% Faktor VII-Aktivität eine sehr viel höhere Restaktivität auf als von LECHNER und DEUTSCH für dieses Mangelplasma (0,25% Faktor VII) angegeben wurde.

Neben Ungenauigkeiten, die bei der Bestimmung einer relativ geringen Faktor VII-Aktivität auftreten können, wenn das zur Bestimmung dieser Aktivität verwendete Mangelplasma selbst eine relativ hohe Faktor VII-Restaktivität aufweist, könnte auch eine andere Proteinbindungscharakteristik der von LECHNER und DEUTSCH verwendeten DEAE-Cellulose für diesen Unterschied in der Faktor VII-Restaktivität der artifiziellen Mangelplasmen verantwortlich gemacht werden: HIMMELHOCH und PETERSON (127) stellten fest, daß bei den ersten kommerziell hergestellten DEAE-Cellulosen nicht nur die Gesamtkapazität, sondern davon unabhängig auch die Proteinbindungscharakteristik der DEAE-Cellulosen verschiedener Hersteller große Unterschiede zeigte. Sogar verschiedene Chargen eines Präparates zeigten Unterschiede. PETERSON (221) machte für diese Unterschiede die Anwesenheit von schwächer basischen N-haltigen Gruppen verantwortlich, die zusammen mit den DEAE-Gruppen in von Charge zu Charge wechselnder Konzentration an die Cellulose-Matrix gebunden waren.

Zahlreiche Modifikationen, die eine weitere Verminderung der Affinität des Faktors VII zum Ionenaustauscher bewirken sollten, führten jedoch nur zu einer gleichmäßig verminderten Adsorption der Faktoren II, VII und X an den Ionenaustauscher; eine weitergehende Trennung des Faktors VII von den Faktoren II und X konnte nicht erreicht werden; dazu wären weitere Präparationsschritte erforderlich gewesen, die wegen der Erhöhung des Arbeitsaufwandes und der Verringerung der Ausbeute zur Herstellung eines routinemäßig verwendeten artifiziellen Mangelplasmas nicht sinnvoll erschienen. Auch die Verwendung von DEAE-Sephadex als Ionenaustauscher erbrachte nur eine geringfügige Verminderung der Aktivität des Faktors VII gegenüber den Faktoren II und X, die sich bei der Verwendung der Plasmafraktionen zur Herstellung eines Mangelplasmas nicht auswirkte (s.u.).

Bei der Chromatographie von Schaf- und Pferdeplasma ergaben sich keine Hinweise dafür, daß mit einer Chromatographie an DEAE-Ionenaustauschern eine Trennung der Vitamin K-abhängigen Faktoren zu erreichen ist.

Bei den Versuchen mit Rinderplasma zeigte sich, daß nach der Adsorption der Gerinnungsfaktoren an DEAE-Cellulose das Prothrombin mit einer 0,2 M NaCl-Lösung eluiert werden konnte, während die Faktoren VII und X an den Austauscher gebunden blieben. Sie konnten in einem weiteren Elutionsschritt ohne Prothrombinverunreinigung eluiert werden (s. Abb. 16). Das Ergebnis ist vergleichbar mit den Ergebnissen, die andere Untersucher (20, 133, 160, 277) bei

der Chromatographie von bovinen Prothrombinkomplex-Präparaten an DEAE-Ionenaustauschern gemacht haben. Auch sie fanden, daß Prothrombin mit Lösungen relativ geringer Ionenstärke eluiert werden konnte, während für die Faktoren VII und X höhere Ionenstärken erforderlich waren.

Das Bindungsverhalten der Faktoren II, VII und X des Schweins an DEAE-Ionenaustauscher unterscheidet sich von dem der vorher erwähnten Spezies: Die Faktoren II und VII passieren die Säule fast ungehindert, während Faktor X quantitativ an den Ionenaustauscher gebunden wird (Abb. 26 und 30). Dies führt dazu, daß bei der Elution der adsorbierten Gerinnungsfaktoren des Schweins neben einer hohen Aktivität des Faktors X nur geringe Aktivitäten der Faktoren II und VII eluiert werden können (Abb. 17).

Die schwache Bindung der Faktoren II und VII an DEAE-Ionenaustauscher wird in Gegenwart von Zitrat noch weiter vermindert (Abb. 26). Dies könnte eine Folge der im Vergleich zum Oxalatplasma höheren Konzentration negativ geladener Ionen sein. Darüberhinaus könnte die verminderte Bindung an den Anionenaustauscher durch Kalziumionen bedingt sein: In Gegenwart von Kalzium-Ionen nimmt die elektrophoretische Beweglichkeit in Richtung Anode von intakten Vitamin K-abhängigen Faktoren ab, was auf eine verringerte negative Ladung hindeutet (167, 237); da im Zitratplasma die Kalzium-Ionen noch vorhanden sind, könnte dies zu einer verminderten negativen Nettoladung der Moleküle führen, die eine geringere Affinität der Moleküle zum Anionenaustauscher zur Folge hat.

Obwohl nach DORFNER (61) die Bindungscharakteristika von DEAE-Cellulose und DEAE-Sephadex keine Unterschiede zeigen, scheint die Fähigkeit des DEAE-Sephadex A 25 zur Bindung des Faktors X größer zu sein als die der DEAE-Cellulose. In Abb. 24 ist der Versuch dargestellt, die Faktor X-Bindungsfähigkeit von DEAE-Cellulose- und DEAE-Sephadex-Säulen gleicher ausnutzbarer Kapazität zu vergleichen. Die ausnutzbare Kapazität des DEAE-Sephadex A 25 wurde auf 1/10 der Gesamtkapazität geschätzt (s.S. 99). Daher betrug die Menge des DEAE-Sephadex das Doppelte der DEAE-Cellulosemenge. Der Vergleich zeigt eine höhere Faktor X-Bindungskapazität des DEAE-Sephadex.

Eine gegenüber dem Faktor X erhöhte Affinität des DEAE-Sephadex zeigt auch der in Abb. 17 dargestellte Versuch. Die Faktoren II, VII und X, die aus je 150ml Schweinezitratplasma an jeweils 5g DEAE-Cellulose bzw. -Sephadex adsorbiert wurden, wurden mit einer gepufferten 1,0 M NaCl-Lösung eluiert. Die Aktivität des Faktors X war gegenüber der Aktivität der Faktoren II und VII in

den Fraktionen des Sephadex-Eluats relativ höher. Dies läßt auf eine geringere Adsorption der Faktoren II und VII an DEAE-Sephadex schließen.

Versuche, die Faktoren II und VII durch stufenweise Steigerung der Ionenstärke zu eluieren, bevor der Faktor X von der Säule verdrängt wurde, hatten keinen Erfolg. Eine weitere Trennung des Faktors X von den Prothrombin- und Faktor VII-Verunreinigungen war also nicht möglich.

Die Ergebnisse dieser orientierenden Versuche zeigten, daß die Reindarstellung der Faktoren II, VII und X aufgrund der engen physikochemischen Verwandtschaft dieser Faktoren in einem einzigen chromatographischen Präparationsschnitt nicht möglich ist; dagegen konnten durch Chromatographie an DEAE-Ionenaustauschern Plasmafraktionen hergestellt werden, in denen die Aktivität eines dieser Faktoren so weitgehend vermindert war, daß die Verwendung dieser Plasmafraktion zur Herstellung eines artifiziellen Mangelplasmas sinnvoll erschien (s.S. 85). Für die Versuche zur Herstellung eines Faktor VII-Mangelplasmas wurde zum einen ein Faktor II/X-Präparat aus Humanplasma und $BaSO_4$-adsorbiertes Plasma, zum andern ein Faktor X-Präparat aus Schweineplasma und asbestfiltriertes Rinderplasma verwendet. Die Herstellung eines Faktor II-Mangelplasmas gelang mit einem Faktor VII/X-Präparat aus Rinderplasma und $BaSO_4$-adsorbiertem Rinderplasma, die Herstellung eines Faktor X-Mangelplasmas gelang mit einem Faktor X-freien Präparat aus Schweineplasma.

Faktor VII-Mangelplasma

Die humanen Plasmafraktionen, in denen die Aktivität des Faktors VII gegenüber der der Faktoren II und X weitgehend vermindert war, wurden nach der Vorschrift von LECHNER und DEUTSCH sowie HEMKER und Mitarb. mit $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma zu einem Faktor VII-Mangelplasma zusammengesetzt. Dabei wurden sowohl Plasmafraktionen verwandt, die nach der Methode von LECHNER und DEUTSCH sowie nach der Methode von HEMKER und Mitarb. hergestellt worden waren, als auch Plasmafraktionen die nach Modifikationen dieser Methoden aufbereitet worden waren (s. Abschnitt 5.3.1). Die Neigungswinkel der Bezugskurven, die unter Verwendung von Calcium-Thromboplastin Roche und diesen Faktor VII-Mangelplasmen erstellt wurden, betrugen zwischen 13^{o} und 20^{o}. Die meisten Bezugskurven waren im log/log-System bis zu einem Aktivitätsbereich von 10% linear. Damit sind diese Bezugskurven hinsichtlich Linearität und Neigungswinkel denen vergleichbar, die HEMKER und Mitarb. sowie LECHNER und

DEUTSCH für ihre Mangelplasmen angaben.

Die Mangelplasmen, zu deren Herstellung humanes $BaSO_4$-adsorbiertes Plasma verwendet wurde, wiesen jedoch eine sehr niedrige Faktor V-Aktivität auf (s. Tab. 5 und 6), sodaß das QUICK'sche Prinzip bei der Verwendung dieser Mangelplasmen zur Faktor VII-Bestimmung offenbar keine Geltung hat. Die Mangelplasmen, zu deren Herstellung bovines $BaSO_4$-adsorbiertes Plasma verwendet wurde, weisen zwar eine hohe Faktor V-Aktivität auf (s. Tab. 6); wie der Neigungswinkel der Bezugskurven, die unter Verwendung dieser Mangelplasmen erstellt wurden (Kurve 4 und 7, Abb. 10), aber zeigt, ist die Empfindlichkeit dieser Methoden gegenüber Faktor VII-Aktivitätsänderungen nicht sehr groß. Der Unterschied in den Reaktionszeiten des Pufferleerwertes und des 100%-Wertes beträgt dabei nur ca. 10 Sekunden. Die Verwendung von Plasmafraktionen, die durch Chromatographie an DEAE-Sephadex hergestellt wurden, führte nicht zu einer Verbesserung der Qualität des Mangelplasmas.

Damit erscheint die Methode zur routinemäßigen Bestimmung der Aktivität des Faktors VII nicht geeignet, weil gerade in einem Bereich der Faktor VII-Aktivität, wie sie z.B. bei der Durchführung einer Antikoagulantientherapie mit Vitamin K-Antagonisten oder bei schweren Lebererkrankungen gemessen wird, die Empfindlichkeit der Methode gegenüber Aktivitätsänderungen des Faktors VII nicht gewährleistet ist.

Ein weiterer Versuch zur Herstellung eines spezifischen Faktor VII-Mangelplasmas wurde mit asbestfiltriertem Rinderplasma als Faktor I-, II- und V-Quelle und einer Faktor X-Präparation, die durch die Adsorption des Faktors X aus Schweineplasma an DEAE-Sephadex und anschließende Elution gewonnen wurde, unternommen. Versuche, das asbestfiltrierte Rinderplasma durch Hinzufügen eines gereinigten Faktor X-Präparates zu einem spezifischen Faktor VII-Mangelplasma zu machen, waren schon von DENSON (47), FISCH (74) und SHAW und Mitarb. (259) unternommen worden. DENSON und FISCH hatten Faktor X durch Papierelektrophorese aus menschlichem Serum gewonnen, SHAW (259) durch Elektrophorese in PVC-Pulver. Obwohl DENSON (47) die Faktoren vor Elektrophorese durch $BaSO_4$-Adsorption und Elution konzentriert hatte, war die Ausbeute bei diesen Präparationen nicht groß; für die Herstellung größerer Mangelplasma-Chargen erscheinen diese Methoden daher nicht geeignet. Das Faktor X-Präparat aus Schweineplasma ließ sich auch in Mengen, die für die Herstellung größerer Mangelplasmachargen nötig sind, herstellen. Das Mangelplasma erwies sich jedoch für Faktor VII-Bestimmung als nicht geeignet (s.S. 92). Der Grund

dürfte in der relativ hohen Faktor VII-Restaktivität des Faktor X-Präparates liegen, die möglicherweise in den nicht dialysierten Faktor X-Präparaten zu niedrig bestimmt wurde (s. auch S. 82).

Faktor II-Mangelplasma

Das Bindungsverhalten der bovinen Faktoren II, VII und X an DEAE-Ionenaustauschern ermöglichte es, ein Konzentrat der Faktoren VII und X herzustellen, das mit $BaSO_4$-adsorbiertem bovinem Plasma zu einem Faktor II-Mangelplasma zusammengesetzt werden konnte. Wie Abb. 16 zeigt, ist die Trennung des an den Ionenaustauscher gebundenen Prothrombins von den ebenfalls an den Austauscher gebundenen Faktoren VII und X durch die Elution mit einer gepufferten 0,2 M NaCl-Lösung möglich; in einem weiteren Elutionsschritt erhält man die Faktoren VII und X ohne Prothrombinverunreinigung. Das Rinderplasma, aus dem die Faktoren II, VII und X an die DEAE-Cellulose-Säule adsorbiert werden, kann nach der Adsorption an $BaSO_4$ zur Herstellung des Mangelplasmas weiterverwendet werden. Die Adsorption an $BaSO_4$ ist erforderlich, weil das Prothrombin nicht vollständig an die DEAE-Cellulose gebunden wird. Eine Dialyse des FaktorVII/X-Konzentrates zur Verminderung der hohen NaCl-Konzentration wird nicht durchgeführt. Zwar ist die NaCl-Konzentration sehr hoch, weil die Faktoren VII und X mit einer 1 M NaCl-Lösung eluiert werden; da aber die Aktivität der Faktoren VII und X im Eluat ebenfalls sehr hoch ist (3000%), benötigt man zur Herstellung des Mangelplasmas nur geringe Mengen des Eluats, das somit entsprechend verdünnt wird: Um bei einer Aktivität des Eluats von 3000% eine Aktivität von 100% Faktor VII oder X in 1000ml Mangelplasma zu erhalten, sind nur 34 ml Eluat erforderlich. Dadurch wird die NaCl-Konzentration im Mangelplasma insgesamt um 0,03 M erhöht.

Die Methode zur Herstellung dieses Mangelplasmas ist der Methode von VERMEER und Mitarb. (283) ähnlich; VERMEER und Mitarb. verwenden ebenfalls ein bovines VII/X-Konzentrat und $BaSO_4$-adsorbiertes Rinderplasma zur Herstellung ihres Faktor II-Mangelplasmas. Die Herstellung des Faktor VII/X-Präparates ist allerdings mit einem größeren Aufwand verbunden (s. Tab. 1).

Die Autoren geben eine außerordentlich hohe Empfindlichkeit dieses Mangelplasmas an; es können Faktor II-Aktivitäten in einem Bereich von unter 1% gemessen werden. Die Empfindlichkeit des hier beschriebenen Mangelplasmas ist nicht so hoch; bei der Verwendung einer 20-fachen Verdünnung eines humanen Nor-

malplasmapools zeigte sich eine Linearität der Bezugskurve in einem Bereich von 100% - 3%. Der Neigungswinkel der Bezugskurve beträgt 21°. Die Empfindlichkeit der Methode ist damit für die meisten Untersuchungen ausreichend. Sollte die Bestimmung einer Aktivität unter 3% erforderlich sein, ist dies bei der Wahl einer anderen Testplasmaverdünnung möglich: Die Bezugskurve des Mangelplasmas zeigt eine Linearität von 40% - 1% im log/log-System, wenn der humane Normalplasmapool 10-fach verdünnt wird (Abb. 21). Bei der Verwendung dieser Verdünnung liegen die Punkte im Aktivitätsbereich über 40% oberhalb der gezeichneten Geraden, d.h. die Gerinnungszeiten werden bei zunehmender Plasma- und damit auch Prothrombinkonzentration nicht entsprechend kürzer. Dieses Verhalten der Bezugskurve läßt an das Vorhandensein eines Inhibitors im Humanplasma denken, der bei höherer Verdünnung nicht mehr wirksam ist.

Das Faktor II-Mangelplasma zeigt bei nicht meßbarem Prothrombinspiegel eine hohe Aktivität der übrigen für den Reaktionsablauf des Extrinsic-Systems erforderlichen Gerinnungsfaktoren (s.S. 96), sodaß dieses Mangelplasma spezifisch auf Änderungen der Prothrombinaktivität reagiert.

Die Stabilität des Mangelplasmas bei der Lagerung bei -40°C wurde anhand von Bezugskurven geprüft, die im Verlauf von 2 Monaten erstellt wurden. Neigungswinkel und Linearität der Bezugskurven änderten sich nicht (s. Abb. 22). Daraus folgt, daß sich die Empfindlichkeit des Mangelplasmas bei der Lagerung nicht verändert.

Spezifität, Empfindlichkeit und Stabilität und die relativ einfache Präparationsmethode lassen dieses Mangelplasma für die Bestimmung der Prothrombinaktivität im Einstufen-Test geeignet erscheinen.

Faktor X-Mangelplasma

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß der Faktor X aus Schweineplasma in einem viel höheren Maße an DEAE-Ionenaustauscher gebunden wurde als die übrigen für den Gerinnungsablauf des Extrinsic-Systems erforderlichen Faktoren, wobei DEAE-Sephadex eine höhere Faktor X-Bindungskapazität als DEAE-Cellulose gezeigt hatte, wurde versucht, das beobachtete Bindungsverhalten der Gerinnungsfaktoren des Schweineplasmas zur Herstellung eines Faktor X-Mangelplasmas auszunützen.

Eine Erhöhung des pH's des Schweineplasmas auf den Wert von 9,0 bei der

Chromatographie, die zu einer höheren negativen Nettoladung und damit theoretisch zu einer größeren Affinität des Faktors X zum Ionenaustauscher hätte führen müssen, resultierte in einer verminderten Bindung des Faktors X an den Ionenaustauscher. Die Erklärung für dieses auf den ersten Blick widersprüchliche Verhalten dürfte in den Puffereigenschaften der DEAE-Gruppen des Ionenaustauschers liegen: Wie die Titrationskurve des DEAE-Sephadex zeigt (222), weist der Ionenaustauscher im Bereich von pH 9,0 Puffereigenschaften auf; d.h., die DEAE-Gruppen können OH-Ionen aufnehmen. Damit vermindert sich die positive Ladung der DEAE-Gruppen, sodaß der Faktor X weniger stark gebunden wird.

In weiteren Versuchen wurden die optimalen Bedingungen für die Herstellung eines Faktor X-Mangelplasmas erarbeitet, wobei sich u.a. herausstellte, daß eine pH-Einstellung des Schweineplasmas vor der Chromatographie sowie eine Dialyse des Schweinemangelplasmas keine Vorteile bringen. Die schließlich entwickelte Präparationsmethode (s. Abb. 29) zeichnet sich neben der durch sie erreichbaren hohen Ausbeute durch ihre Einfachheit aus. Von der Zentrifugation des Schweinezitratblutes abgesehen, ist nur ein einziger Präparationsschritt erforderlich.

Die Reproduzierbarkeit der Herstellungsmethode wurde hinsichtlich des Faktorengehalts der einzelnen Mangelplasmachargen sowie der Empfindlichkeit gegenüber Faktor X-Aktivitätsänderungen überprüft. Die untersuchten Parameter zeigten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen, sodaß die Reproduzierbarkeit der Herstellungsmethode als gut bezeichnet werden muß.

Die Eigenschaften des Schweinesubstratplasmas, die in der Spezifität, der Restaktivität an Faktor X und der Empfindlichkeit gegenüber Aktivitätsänderungen des Faktors X zum Ausdruck kommen, sind denen eines natürlichen humanen Faktor X-Mangelplasmas vergleichbar (s.S. 119, S. 115, S. 120). Bei der gegenseitigen Messung der Faktor X-Restaktivität im Schweinesubstratplasma und im humanen natürlichen Mangelplasma scheinen die Chargen des Schweinesubstratplasmas einen etwas höheren Faktor X-Gehalt zu haben (s.S. 116). Dabei ist jedoch die Faktor X-Restaktivität des Schweinesubstratplasmas möglicherweise zu hoch angegeben, weil die QUICK'sche Forderung nach einem Überschuß aller übrigen Faktoren im Substratplasma nicht erfüllt war, wenn die Faktor X-Restaktivität des Schweinesubstratplasmas mit dem humanen natürlichen Mangelplasma gemessen wurde: Die Aktivität des Faktors V in Schweineplasma ist auch bei der 10-fachen Verdünnung, wie sie bei der Bestimmung angewandt wurde, immer noch höher als die Aktivität des Faktors V eines humanen

Plasmas (s. Tab. 9). Die Faktor VII-Aktivität des Schweinesubstratplasmas ist ebenfalls sehr hoch. Die Höhe der Aktivität der Gerinnungsfaktoren im natürlichen humanen Substratplasma reichte deshalb möglicherweise für eine spezifische Faktor X-Bestimmung nicht aus.

Faktor X-Bestimmungsmethoden mit Schweinemangelplasma unter Verwendung verschiedener thromboplastischer Aktivatoren des Extrinsic und Intrinsic Systems wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Faktor X-Aktivitätsänderungen überprüft. Bei der Verwendung von Thromboplastinpräparaten aus verschiedenen Organen zur Faktor X-Bestimmung mit der Schweinesubstratplasma-Methode konnte die Erfahrung früherer Untersucher (s.S. 31) bestätigt werden, daß Thromboplastinpräparate aus Lungengeweben besonders Faktor X-empfindlich sind: Die höchste Empfindlichkeit der Methode zeigte sich bei der Verwendung eines Lungenthromboplastins (Calcium-Thromboplastin Roche), die Verwendung von Präparaten aus Lunge und Hirn (Simplastin, Simplastin Automated) brachte eine Verminderung der Empfindlichkeit der Methode mit sich. Bei der Verwendung von reinen Hirnthromboplastinpräparaten, insbesondere BCT und Calcium-Thromboplastin Boehringer zeigten geringer Neigungswinkel und fehlende Linearität der Bezugskurven eine weitere Minderung der Empfindlichkeit der Methoden an (s. Abb. 33 und 34).

Bei der Verwendung von RVV und Phospholipiden als thromboplastischem Aktivator zeigte die Schweineplasma-Methode eine ausreichende Empfindlichkeit gegenüber Aktivitätsänderungen des Faktors X (s. Abb. 35); wegen der auftretenden Instabilität des Testsystems ist die Verwendung von RVV jedoch nicht zu empfehlen (s.S.126). Die Versuche, bei denen Aktivatoren des Intrinsic Systems eingesetzt wurden, zeigten eine Umempfindlichkeit der Schweineplasma-Methode gegenüber Faktor X-Aktivitätsänderungen.

Die Stabilität des Mangelplasmas (s.S. 127, S. 130) sowie die Reproduzierbarkeit der Faktor X-Bestimmungen (s.S. 126) sind ausgezeichnet.

Bei der vergleichenden Bestimmung von Faktor X-Aktivitäten in verschiedenen Plasmen mit der Schweineplasma-Methode sowie mit der Methode von BACHMANN und Mitarb. (18) und einer Methode unter Verwendung eines natürlichen Mangelplasmas zeigte sich eine ausreichende Übereinstimmung der mit den verschiedenen Methoden gemessenen Werte. Allerdings gibt die Schweineplasma-Methode im Vergleich zur Methode von BACHMANN und Mitarb. die Faktor X-Aktivität von Patienten unter Marcumar-Therapie niedriger an; dies könnte auf einer höheren Empfindlichkeit gegenüber PIVKA-X beruhen.

Damit erscheint das Schweinesubstratplasma für Einstufen-Methoden zur Bestimmung des Faktors X bestens geeignet.

7 Zusammenfassung

Nach einem kurzen Überblick über die Geschichte der Entdeckung der Gerinnungsfaktoren sowie der damit verbundenen Entwicklung von Hypothesen des Gerinnungsablaufs werden Biochemie, Physiologie und Pathophysiologie der Gerinnungsfaktoren II, VII und X und des Gewebsfaktors ausführlich dargestellt. Anschließend werden die Methoden zur Bestimmung der Aktivität von Gerinnungsfaktoren, d.h. Einstufen-, Zweistufen- und Methoden unter Verwendung chromogener Substrate, geschildert. Das Prinzip der Einstufen-Methoden, die von der QUICK'schen Methode zur Bestimmung der Prothrombinkonzentration abgeleitet sind, sowie die Notwendigkeit der Herstellung artifizieller Mangelplasmen werden erläutert. Bekannte spezifische Einstufen-Methoden zur Bestimmung der Faktor II-, VII-, X-Aktivität werden tabellarisch dargestellt.

Im experimentellen Teil der Arbeit werden zunächst die orientierenden Versuche beschrieben, in denen eine Trennung der Faktoren II, VII und X aus den Plasmen von Mensch, Schaf, Pferd, Rind und Schwein vorwiegend unter Anwendung der Chromatographie von DEAE-Ionenaustauschern erreicht werden sollte. Aus den Plasmen von Mensch, Rind und Schwein konnte aufgrund des von Spezies zu Spezies unterschiedlichen Adsorptionsmusters der Gerinnungsfaktoren II, VII, X an die DEAE-Ionenaustauscher Fraktionen hergestellt werden, in denen die Aktivität eines Gerinnungsfaktors so vermindert war, daß diese Plasmafraktion zur Herstellung eines Mangelplasmas geeignet schien. Die Trennung der Faktoren II, VII und X aus Schafs- oder Pferdeplasma war dagegen nicht möglich.

Die Herstellung eines Faktor VII-Mangelplasmas nach der Methode von LECHNER und DEUTSCH sowie mit Modifikationen dieser Methode wurde mit Hilfe von $BaSO_4$-adsorbiertem Plasma und einer Plasmafraktion mit einem hohen Faktor II/X-Gehalt und niedrigem Faktor VII-Gehalt versucht, die aus Humanplasma durch Adsorption und Elution von DEAE-Ionenaustauschern gewonnen wurde. Die auf diese Weise hergestellten Mangelplasmen zeigten im Aktivitätsbereich unterhalb 30% - 20% eine relativ geringe Empfindlichkeit auf Aktivitätsänderungen des Faktors VII; dies dürfte auf die relativ hohe Faktor VII-Restaktivität zurückzuführen sein, die auch durch die erwähnten Modifikationen nicht vermindert werden konnte. Daher erschienen diese Mangelplasmen zur Durchführung von Routineuntersuchungen wenig geeignet.

Ein weiterer Versuch zur Herstellung eines Faktor VII-Mangelplasmas wurde unter Verwendung von asbestfiltriertem Rinderplasma und eines Faktor X-Präpa-

rates aus Schweineplasma, das durch Adsorption und Elution der Gerinnungsfaktoren an DEAE-Sephadex erhalten wurde, unternommen; das Mangelplasma zeigte jedoch keine Empfindlichkeit auf Veränderungen der Faktor VII-Aktivität.

Durch Adsorption von Rinderoxalatplasma an DEAE-Cellulose und anschließende zweistufige Elution der adsorbierten Gerinnungsfaktoren konnte eine prothrombinfreie Plasmafraktion mit einer hohen Faktor VII- und Faktor X-Aktivität erhalten werden. Diese Plasmafraktion wurde mit $BaSO_4$-adsorbiertem Rinderplasma zu einem Prothrombinmangelplasma rekombiniert. Nicht meßbare Prothrombinaktivität und eine hohe Aktivität der anderen für den Reaktionsablauf des Extrinsic Systems erforderlichen Gerinnungsfaktoren, sowie Steilheit und Linearität der Bezugskurven, die unter Verwendung dieses Mangelplasmas hergestellt wurden, lassen auf eine hohe und spezifische Empfindlichkeit des Mangelplasmas auf Veränderungen der Prothrombinaktivität schließen. Das Mangelplasma bleibt über einen Zeitraum von mindestens 2 Monaten stabil. Aufgrund dieser Eigenschaften erscheint das Mangelplasma zur routinemäßigen Bestimmung der Prothrombinaktivität geeignet.

Die Präparation eines Faktor X-Mangelplasmas gelang durch Chromatographie von Schweineplasma an DEAE-Ionenaustauschern, wobei der Faktor X quantitativ an den Ionenaustauscher gebunden wurde und die anderen für den Reaktionsablauf des Extrinsic Systems erforderlichen Gerinnungsfaktoren an die Austauschersäule in sehr viel geringerem Ausmaß gebunden wurden. Die Faktoren II und VII wurden aus Zitratplasma noch schwächer an den Ionenaustauscher gebunden als aus Oxalatplasma. Diese Beobachtung wird mit einer Verringerung der negativen Nettoladung der Faktoren durch die im Zitratplasma noch vorhandenen Kalzium-Ionen erklärt.

Die schließlich entwickelte Präparationsmethode zeichnet sich durch ihre Einfachheit und gute Reproduzierbarkeit aus. Die hohe Spezifität und Empfindlichkeit von Faktor X-Bestimmungsmethoden unter Verwendung dieses Mangelplasmas lassen sich aus der niedrigen Faktor X-Restaktivität, aus der hohen Aktivität der übrigen für den Gerinnungsablauf des Extrinsic Systems erforderlichen Gerinnungsfaktoren sowie aus dem Neigungswinkel der Bezugskurven erkennen. Anhand des Neigungswinkels und der Linearität von Bezugskurven, die unter Verwendung von Schweinemangelplasma und von Thromboplastinpräparaten aus verschiedenen Organen erstellt wurden, konnte die Erfahrung früherer Untersucher bestätigt werden, daß Thromboplastinpräparate aus Lungengewebe empfindlicher auf Faktor X-Aktivitätsänderungen reagieren als Präparate aus

Hirngewebe.

Die Reproduzierbarkeit der mit dem Mangelplasma gemessenen Werte sowie die Stabilität des Mangelplasmas sind ausgezeichnet. Bei einem Vergleich der Faktor X-Aktivitäten, die in den Plasmen verschiedener Patienten parallel mit der Schweineplasma-Methode, mit der Methode von BACHMANN und Mitarb. (18) und mit einer Methode unter Verwendung eines natürlichen Mangelplasmas bestimmt wurden, zeigt sich eine gute Übereinstimmung der ermittelten Werte. Allerdings zeigte die Schweinemangelplasma-Methode an den Plasmen von Patienten, die unter einer Therapie mit indirekten Antikoagulantien standen, niedrigere Aktivitäten an als die Methode von BACHMANN und Mitarb., was auf einer höheren Empfindlichkeit gegenüber PIVKA-X beruhen könnte.

8 Literatur

1 ABALLI, A., V. LOPEZ BANUS, S. de LAMERENS, S. ROZENGVAIG: Coagulation Studies in the Newborn Period
Am. J. Dis. Child. 94: 589 (1957)

2 ABALLI, A., S. de LAMERENS: Coagulation changes in the neonatal period and in early infancy
Pediatr. Clin. North. Am. 9: 785 (1962)

3 ACKROYD, J.: The Function of Factor VII
Br. J. Haematol. 2: 397 (1956)

4 ALEXANDER, B.: Some biochemical, physikochemical and immunochemical studies of prothrombin and proconvertin (Factor VII):
Their biopathologic significance in:
E. Deutsch: Blood clotting factors
Pergamon Press New York (1959)

5 ALEXANDER, B., R. GOLDSTEIN, G. LANDWEHR, C. COOK: Congenital SPCA deficiency: A hitherto unrecognized coagulation defect with hemorrhage recitified by serum and serum fractions
J. Clin. Invest. 30: 596 (1951)

6 ALEXANDER, B., G. LANDWEHR: Evolution of a prothrombin conversion accelerator in stored human plasma and prothrombin fractions
Am. J. Physiol. 159: 322 (1949)

7 ALEXANDER, B., A. de VRIES, R. GOLDSTEIN: A factor in serum which accelerates the conversion of prothrombin to thrombin II. Its Evolution with Special Reference to the Influence of Conditions which Affect Blood Coagulation
Blood 4: 739 (1949)

8 ALTMAN, R., H. HEMKER: Contact Activation in the Extrinsic Blood Clotting System
Thromb. Diath. haemorrh. 18: 525 (1967)

9 ARCHER, R.: Blood coagulation in non-human vertebrates in:
R. Macfarlane:

The Haemostatic Mechanism in Man and Other Animals
Academic Press London 1970

10 ARONSON, D.: Chromatographic Differentiation of Human Prothrombins
Thromb. Diath. haemorrh. 16: 491 (1966)

11 ARONSON, D., A. MUSTAFA: The Activation of Human Factor X in Sodium Citrate: the Role of Factor VII
Thromb. Haemost. 36: 104 (1976)

12 ARONSON, D., L. STEVAN, A. BALL, B. FRANZA jr., J. FINLAYSON: Generation of the Combined Prothrombin Activation Peptide F1·2) during the Clotting of Blood and Plasma
J. Clin. Invest. 60:1410 (1977)

13 AVERDUNK, R., J. BRAUN: Über die Aktivität von Reagenzien zur Thromboplastinzeit-Bestimmung (Quick-Wert) verschiedener Hersteller bei Konzentrationsveränderungen einzelner Gerinnungsfaktoren
Blut 24: 303 (1972)

14 BABIOR, B.: The role of vitamin K in clotting factor synthesis
I Evidence for the participation of vitamin K in the conversion of a polypeptide precursor to factor VII
Biochim. Biophys.Acta 123: 606 (1966)

15 BACHMANN, F., F. DUCKERT, P. FLOCKIGER, W. HITZIG: Hämorrhagische Diathesen, verursacht durch Mangel des Stuart-Prower-Faktors
Schweiz. Med. Wochenschr. 87: 1221 (1957)

16 BACHMANN, F., F. DUCKERT, P. FLOCKIGER, W. HITZIG, F. KOLLER: Über einen neuartigen Gerinnungsdefekt (Mangel an Stuart Faktor)
Thromb. Diath. haemorrh. 1: 87 (1957)

17 BACHMANN, F., F. DUCKERT, M. GEIGER, P. BAER, F. KOLLER: Differentiation of the Factor VII Complex. Studies on the Stuart-Prower-Faktor
Thromb. Diath. haemorrh. 1: 169 (1957)

18 BACHMANN, F., F. DUCKERT, F. KOLLER: The Stuart-Prower-Factor Assay and its Clinical Significance
Thromb. Diath. haemorrh. 2: 24 (1958)

19 BAJAJ, S., R. BUTKOWSKI, K. MANN: Prothrombin Fragments Ca^{2+} bindung and activation kinetics
J. Biol. Chem. 250: 2150 (1975)

20 BAJAJ, S., K. MANN: Simultaneous Purification of Bovine Prothrombin and Factor X. Activation of prothrombin by Trypsin-activated factor X
J. Biol. Chem. 248: 7729 (1973)

21 BARNHART, M.: Cellular site for prothrombin synthesis
Am. J. Physiol. 199: 360 (1960)

22 BEESER, H.: Untersuchungen zur Reindarstellung von Prothrombin
Inaugural-Dissertation Bonn (1970)

23 BEESER, H.: Untersuchungen zur Frage der Aktivierung von gereinigtem Humanprothrombin zu Thrombin und Factor IX
Ein Beitrag zur Reaktionskinetik des Gerinnungsablaufs
Habilitationsschrift Bonn (1973)

24 BEESER, H., H. EGLI: Studies on the Precursor of Factor IX Activity
Abstr. Nr. 306 XIV Int. Congr. Hematol. Sao Paulo (1972)

25 BERGSAGEL, D., E. NOCKOLDS: The Activation of Proaccelerin
Br. J. Haematol. 11: 395 (1965)

26 BERGSTRÖM, K., M. BLOMBÄCK: Determination of plasma prothrombin with a reaction rate analyzer using a sythetic substrate
Thromb. Res. 4: 719 (1974)

27 BIGGS, R., K. DENSON: The Fate of Prothrombin and Factors VIII, IX, and X transfused to Patients deficient in these factors
Br. J. Haematol. 9: 532 (1963)

28 BIGGS, R., A.S. DOUGLAS: The thromboplastin generation test
J. Clin. Path. 6: 23 (1953)

29 BIGGS, R., R. MACFARLANE: Human blood coagulation and its disorders
Blackwell Scientific Publications Oxford (1957)

30 BORCHGREVINK, C., O. EGEBERG, J. POOL, T. SKULASON, H. STORMORKEN, B. WAALER: A Study of a Case of Congenital Hypoprothrombinaemia
Br. J. Haematol. 5: 294 (1959)

31 BORGOLTE, H.: Veränderungen der haemostyptischen Funktion gelagerten ACD-Blutes bei Variationen des Entnahmeverfahrens
Inaugural-Dissertation Bonn (1969)

32 BROZOVIC, M., Y. STIRLING, C. HARRICKS, W.R.S. NORTH, T.W. MEADE: Factor VII in an Industrial Population
Br. J. Haematol. 28: 381 (1974)

33 BUCHER, D.E. NEBELIN, J. THOMSEN and J. STENFLO: Identification of γ-carboxyglutamic acid residues in bovine faktors IX and X, and in a new vitamin K-dependent protein
FEBS Letters 68: 293 (1976)

34 BULUK, K., T. JANUSZKO, J. OLBROMSKI: Conversion of Fibrin to Desmofibrin
Nature 191: 1093 (1961)

35 BUTKOWSKI, R.J., S.P. BAJAJ, K.G. MANN: The Preparation and Activation of (sialyl-^{3}H)Prothrombin
J. Biol. Chem. 249: 6562 (1974)

36 CASILLAS, G., C. SIMONETTI, A. PAVLOVSKY: Chromatographic Behavior of Clotting Factors
Brit. J. Haematol. 16: 363 (1969)

37 CHAN, J.Y.C., C.E. BURROWES, H.Z. MOVAT: Activation of factor XII (Hagemann factor): Enhancing effect of a potentiator
Thromb. Res. 1: 309 (1977)

38 CHAN, J.Y.C., F.M. HABAL, C.E. BURROWES, H.Z. MOVAT: Interaction between factor XII (Hagemann factor), high molecular weight kininogen and prekallikrein
Thromb. Res. 9: 423 (1976)

39 CHUNG, G.C., R. DELANEY, D. MACK, B.C. JOHNSON: A Vitamin K-dependent enzyme which converts a precursur protein to factor VII
Fed. Proc. 33: 1473 (1974)

40 CLAESON, G., L. AURELL, G. KARLSSON, P. FRIBERGER: Substrate structure and activity relationship in:
I. Witt, Ed. Neue Methoden der Gerinnungsanalyse mit chromogenen Substraten S. 37
Walter de Gruyter Berlin (1977)

41 CLAUSS, A.: Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens
Acta haematol. 17: 237 (1957)

42 CLETON, J.F., E.A. LOELIGER: Two Typical Hereditary Charts of Congenital Factor VII Deficiency
Thromb. Diath. haemorrh. 5: 87 (1960)

43 COCHRANE, C.G., K.D. WUEPPER: The first component of the Kinin-forming system in human and rabbit plasma. Its Relationship to Clotting Factor XII (Hagemann Factor)
J. Exp. Med. 134: 986 (1971)

44 COLMAN, R.W.: The Effect of Proteolytic Enzymes on Bovine Factor V. I. Kinetics of Activation and Inactivation by Bovine Thrombin
Biochemistry 8: 1438 (1969)

45 COX, A.C., D.J. HANAHAN: The isolation of undegraded bovine prothrombin and its partial characterization
Biochem. Biophys. Acta 207: 49 (1970)

46 DAVIE, E.W., O.D. RATNOFF: Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting
Science 145:1310 (1964)

47 DENSON, K.W.: The Specific Assay of Prower-Stuart Factor and Factor VII
Acta haematol. 25: 105 (1961)

48 DENSON, K.W.E.: Tissue Extracts and their Sensitivity to Factor VII and Factor X
Thromb. Diath. haemorrh. 11:146 (1964)

49 DENSON, K.W.E.: The Levels of Factors II, VII, IX and X by Antibody Neutralization Techniques in the Plasma of Patients Receiving Phenindione Therapy
Br. J. Haematol. 20: 643 (1971)

50 DENSON, K., R. BIGGS: Laboratory Diagnosis, Tests of Clotting Function and their Standardization in:
R. Biggs Ed. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis
Second edition
Blackwell Scientific Publications Oxford (1976)

51 DENSON, K.W.E., R. BORRETT, R. BIGGS: The Specific Assay of Prothrombin Using the Taipan Snake Venom
Br. J. Haematol. 21: 219 (1971)

52 DEUTSCH, E., K. IRSIGLER, H. LOMOSCHITZ: Studien über Gewebethromboplastin. 1. Reinigung, chemische Charakterisierung und Trennung in einen Eiweiß- und Lipoidanteil.
Thromb. Diath. haemorrh. 12: 12 (1964)

53 DIKE, G.W.R., E. BIDWELL, C.R. RIZZA: The Preparation and Clinical Use of a New Concentrate Containing Factor IX, Prothrombin and Factor X and of a Separate Concentrate Containing Factor VII
Br. J. Haematol. 22: 469 (1972)

54 DISCHE, F.E., V. BENFIELD: Congenital Factor VII Deficiency. Haematological and Genetic Aspects
Acta haematol. 21: 257 (1959)

55 DI SCIPIO, R.G., M.A. HERMODSON, S.G. YATES, E.W. DAVIE: A Comparison of Human Prothrombin, Factor IX (Christmas Factor), Factor X (Stuart Factor), and Protein S
Biochemistry 16: 698 (1977)

56 DI SCIPIO, R.G., K. KURACHI, E.W. DAVIE: Activation of Human Factor IX (Christmas Factor)
J. Clin. Invest. 61: 1528 (1978)

57 DITTMER, D.S., Ed.: Blood an other Body Fluids
Federation of American Societies for Experimental Biology
Washington, D.C. S. 22, S. 36 (1961)

58 DODDS, W.J.: Storage, release, and synthesis of coagulation factors in isolated perfused organs
Am. J. Physiol. 217: 879 (1969)

59 DODDS, W.J., A.C. MOYNIHAN, R.E. BENSON, C.A. HALL: The Value of Age- and Sex-Matched Controls for Coagulation Studies
Br. J. Haematol. 29: 305 (1975)

60 DONALDSEN, V., C. KISKER: Blood Coagulation in Hemostasis in: D. Nathan, F. Oski Ed. Hematology of Infancy and Childhood Saunders, Philadelphia (1974)

61 DORFNER, K.: Ionenaustauscher
Walter de Gruyter & Co. Berlin (1970)

62 DOWNING, M.R., R.J. BUTKOWSKI, M.M. CLARK, K.G. MANN: Human Prothrombin Activation
J. Biol. Chem. 250: 8897 (1975)

63 EGLI, H., H. BUSCHA: Zur Differenzierung und Kalzium-Abhängigkeit von Kontaktwirkungen benetzbarer Oberflächen. Ihr Einfluß auf die Blut-thrombokinase-Bildung
Thromb. Diath. haemorrh. 3: 604 (1959)

64 EGLI, H., W. SCHNEIDER: Untersuchungen über den Faktor IX
Thromb. Diath. haemorrh. 7: 523 (1962)

65 ENFIELD, D.L., L.H. ERICSSON, K. FUJIKAWA, K. TITANI, K.A. WALSH, H. NEURATH: Bovine factor IX (Christmas factor). Further evidence of homology with factor X (Stuart factor) and prothrombin
FEBS Letters 47: 132 (1974)

66 ENFIELD, D.L., L.H. ERICSSON, K.A. WALSH, H. NEURATH, K. TITANI: Bovine Factor X_1 (Stuart Factor). Primary Structure of the Light Chain
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 16 (1975)

67 ENGVALL, E., E. RUOSLAHTI, E.J. MILLER: Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen
J. Exp. Med. 147: 1584 (1978)

68 ESMEN, C.T., W.G. OWEN, D.L. DUIGUID, C.M. JACKSON: The action of thrombin on blood clotting factor V: conversion of factor V to a prothrombin-binding protein
Biochim. Biophys. Acta 310: 289 (1973)

69 ESMON, C.T., W.G. OWEN, G.M. JACKSON: The Conversion of Prothrombin to Thrombin II
J. Biol. Chem. 249: 606 (1974)

70 ESNOUF, M.: Prothrombin in: R. Biggs
Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis
Second edition
Blackwell Scientific Publications Oxford (1976)

71 ESNOUF, M.P., P.H. LLOYD, J. JESTY: A Method for the Simultaneous Isolation of Factor X and Prothrombin from Bovine Plasma
Biochem. J. 131: 781 (1973)

72 FERGUSON, J.H., E.G. WILSON ENNIS: Enzymes and Blood Clotting. II. Autoprothrombin C, Russel's Viper Venom (Stypven), and Trypsin
Thromb. Diath. haemorrh. 9: 62 (1963)

73 FINKBINER, R.B., J.J. McGOVERN, R. GOLDSTEIN, J.P. BUNKER, A. YANAKIS, R. LANGER: Coagulation Defects in Liver Disease and Response to Transfusion During Surgery

Am. J. Med. 26: 199 (1959)

74 FISCH, U.: Über einen neuen Accelerator der Blutthrombokinasebildung
Thromb. Diath. haemorrh. 2: 60 (1958)

75 FRYKLUND, L., H. BORG, L.O. ANDERSSON: Amino-terminal siquence of human factor IX: presence of γ-carboxyl glutamic acid residues
FEBS Letters 65: 187 (1976)

76 FUJIKAWA, K., M.H. COAN, D.L. ENFIELD, K. TITANI, L.H. ERICSSON, E.W. DAVIE: A Comparison of Bovine Prothrombin, Factor IX (Christmas Factor), and Factor X (Stuart Factor)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 427 (1974)

77 FUJIKAWA, K., M.H. COAN, M.E. LEGAZ, E.W. DAVIE: The Mechanism of Activation of Bovine Factor X (Stuart Factor) by Intrinsic and Extrinsic Pathways
Biochemistry 13: 5290 (1974)

78 FUJIKAWA, K., M.E. LEGAZ, E.W. DAVIE: Bovine Factors X_1 and X_2 (Stuart Factor). Isolation and Characterization
Biochemistry 11: 4882 (1972)

79 FUJIKAWA, K., M.E. LEGAZ, E.W. DAVIE: Bovine Factor X_1 (Stuart Factor). Mechanism of Activation by a Protein from Russell's Viper Venom
Biochemistry 11: 4892 (1972)

80 FUJIKAWA, K., M.E. LEGAZ, H. KATO, E.W. DAVIE: The Mechanism of Activation of Bovine Factor IX (Christmas Factor) by Bovine Factor XI_a (Activated Plasma Thromboplastin Antecedent)
Biochemistry 13: 4508 (1974)

81 FUJIKAWA, K., A. THOMPSON, M. LEGAZ: Biological properties of bovine factor X (stuart factor)
Fed. Proc. 30: 1075 Abstr. 135 (1971)

82 FUJIKAWA, K., K. TITANI, E.W. DAVIE: Activation of bovine factor X (Stuart factor): Conversion of factor $X_{a\alpha}$ to factor $X_{a\beta}$
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3359 (1975)

83 FURIE, B.C., B. FURIE, A.J. GOTTLIEB, W.J. WILLIAMS: Activation of bovine factor X by the venom coagulant protein of Vipera Russelli: complex formation of the activation fragments
Biochim. Biophys. Acta 365: 121 (1974)

84 GALLIMORE, M.J., E. FAREID, H. STORMORKEN: Purification of a human plasma kallikrein with weak plasminogen activator activity
Thromb. Res. 12: 409 (1978)

85 GANROT, P.O., J.E. NILEHN: Plasma Prothrombin during Treatment with Dicumarol
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 22: 23 (1968)

86 GARNER, R., D.M. CONNING: The Assay of Human Factor VII by Means of Modified Factor VII Deficient Dog Plasma
Br. J. Haematol. 18: 57 (1970)

87 GAUDERNACK, G., A.G. BERRE, B. ØSTERUD, H. PRUYDZ: Immunological Studies on the Blood Coagulation Factor X and Its Warfarininduced Precursor
Thromb. Diath. haemorrh. 31: 40 (1974)

88 GAUDERNACK, G., H. PRYDZ: Studies of PIVKA-X
Thromb. Diath. haemorrh. 34: 455 (1975)

89 GEIGY, J.R. A.G.: DOCUMENTA GEIGY
Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage

90 GIDDINGS, J.C., A.L. BLOOM: Factor V-Activation by Thrombin and its Role in Prothrombin Conversion
Br. J. Haematol. 29: 349 (1975)

91 GIROLAMI, A., A. BRUNETTI, L. DeMARCO, D. FIORETTI: Dilution Curve Studies in Prothrombin Complex Factors Deficiendies and Abnormalities
Blut 29: 134 (1974)

92 GIROLAMI, A., A. BRUNETTI, G. PATRASSI: Dilution Curve Studies in Coumarin Plasmas and in artificially depleted abnormal Control Plasmas
Blut 28: 351 (1974)

93 GIROLAMI, A., R. VENTURELLI, G. CELLA, L. VIRGOLINI, A. BURUL: Combined Hereditary Deficiency of Factors VII and VIII
Acta haematol. 55: 181 (1976)

94 GIROLAMI, A., G. BAREGGI, A. BRUNETTI, A. STICCHI: Prothrombin Padua: A "new" congenital dysprothrombinemia
J. Lab. Clin. Med. 84: 654 (1974)

95 GIROLAMI, A., F. FABRIS, R. DAL BO ZANON, G. GHIOTTO, A. BURUL: Factor VII Padua: a congenital coagulation disorder due to an abnormal factor VII with a peculiar activation pattern
J. Lab. Clin. Med. 91: 387 (1978)

96 GIROLAMI, A., G. MOLARO, M. LAZZARIN, R. SCARPA, A. BRUNETTI: A "New" Congenital Haemorrhagic Condition due to the Presence of an Abnormal Factor X (Factor X Friuli): Study of a Large Kindred
Br. J. Haematol. 19: 179 (1970)

97 GITEL, S.N., W.G. OWEN, C.T. ESMON, C.M. JACKSON: A Polypeptide Region of Bovine Prothrombin Specific for Binding to Phospholipids
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 1344 (1973)

98 GJØNNAESS, H.: Cold Promoted Activation of Factor VII I. Evidence for the Existence of an Activator
Thromb. Diath. haemorrh. 28: 155 (1972)

99 GJØNNAESS, H.: Cold Promoted Activation of Factor VII II. Identification of the Activator
Thromb. Diath. haemorrh. 28: 169 (1972)

100 GJØNNAESS, H.: Cold Promoted Activation of Factor VII III. Relation to the Kallikrein System
Thromb. Diath. haemorrh. 28: 182 (1972)

101 GJØNNAESS, H.: Cold Promoted Activation of Factor VII IV. Relation to the Coagulation Systems
Thromb. Diath. haemorrh. 28: 194 (1972)

102 GJØNNÆSS, H.: Cold Promoted Activation of Factor VII
V. Relation to the Fibrinolytic System
Thromb. Diath. haemorrh. 29: 143 (1973)

103 GJØNNÆSS, H.: Cold Promoted Activation of Factor VII
VI. Effect of Inhibitors
Thromb. Diath. haemorrh. 29: 633 (1973)

104 GJØNNÆSS, H.: Cold Promoted Activation of Factor VII
Occurrence and Relation to Sex Hormones and Antifertility Compounds
Gynecol. Invest. 4: 61 (1973)

105 GJØNNÆSS, H., M.K. FAGERHOL, H. STORMORKEN: Studies on coagulation and fibrinolysis in blood from puerperal women with and without oestrogen treatment
Br. J. Obstet. Gynaecol. 82: 151 (1975)

106 GLADHAUG, A., H. PRYDZ: Purification of the coagulation factors VII and X from human serum
Some Properties of Factor VII
Biochim. Biophys. Acta 215: 105 (1970)

107 GLADHAUG BERRE, A., B. ØSTERUD, T.B. CHRISTENSEN, T. HOLM, H. PRYDZ: Some Characteristics of the Coagulation Factor Xa purified from Human Serum
Biochem. J. 135: 791 (1973)

108 GLAS, P., T. ATRUP: Thromboplastin and plasminogen activator in tissues of the rabbit
Am. J. Physiol. 219: 1140 (1970)

109 GOLDSMITH, J.C., K.S. CHUNG, H.R. ROBERTS: A simple assay for human factor IX: Use of canine hemophilia B plasma as substrate
Thromb. Res. 12: 497 (1978)

110 GOLDSMITH, G.H., H. SAITO, O.D. RATNOFF: The Activation of Plasminogen by Hageman Factor (Factor XII) and Factor Fragments
J. Clin. Invest. 62: 54 (1978)

111 GOODNIGHT, S.H., jr., D.T. FEINSTEIN, B. ØSTERUD, S.I. RAPAPORT: Factor VII Antibody-neutralizing Material in Hereditary and Acquired Factor VII Deficiency
Blood 38: 1 (1971)

112 GRIFFIN, J.H.: New hypothesis for the molecular mechanism of surface-dependent activation of Hageman factor (Factor XII)
Thromb. Haemost. 38: 50 (1977)

113 GRIFFIN, J.H.: Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation Factor XII)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 1998 (1978)

114 GROSS, R., D. VOSS: Blutgerinnungskontrollen bei der ambulanten Anwendung von Antikoagulantien
Suppl. 12 ad Thromb. Diath. haemorrh. S. 27 Stuttgart (1964)

115 GUTJAHR, W.: Untersuchungen über Einstufen-Methoden zur Bestimmung der Faktor IX-Aktivität
Inaugural-Dissertation Bonn (1968)

116 HALL, C.A., A.R. LONDON, A.C. MOYNIHAN, W.J. DODDS: Hereditary Factor VII and IX Deficiencies in a Large Kindred
Br. J. Haematol. 29: 319 (1975)

117 HARMISON, C.R., H. SCHRÖER, W.H. SEEGERS: Some Properties of Autoprothrombin I_C
Thromb. Diath. haemorrh. 13: 587 (1965)

118 HELDEBRANT, C.M., R.J. BUTKOWSKI, S.P. BAJAJ, K.G. MANN: The Activation of Prothrombin II
J. Biol. Chem. 248: 7149 (1973)

119 HELDEBRANT, C.M., K.G. MANN: The Activation of Prothrombin I
J. Biol. Chem. 248: 3642 (1973)

120 HELLEMANS, J., R. DE VREKER, M. VORLAT, M. VERSTRAETE: Turnover of Prothrombin and Factors VII, IX and X in States of Hypocoagulability
Acta haematol. 30: 35 (1963)

121 HEMKER, H.C., J.J. VELTKAMP, E.A. LOELIGER: Kinetic Aspects of the Interaction of Blood Clotting Enzymes
III. Demonstration of an Inhibitor of Prothombin Conversion in Vitamin K Deficiency
Thromb. Diath. haemorrh. 19: 346 (1968)

122 HEMKER, H.C., M.J. LINDHOUT, P.P.M. REEKERS: 4. Demonstration of Three Proteins Induced by Vitamin K Absence (PIVKAs)
Suppl. 59 ad Thromb. Diath. haemorrh. Stuttgart (1974) S. 45

123 HEMKER, H.C., A.C.W. SWART, A.J.M. ALINK: Artificial Reagents for Factor VII and Factor X, a Computer Programme for Obtaining Reference Tables for One-Stage Determinations in the Extrinsic System
Thromb. Diath. haemorrh. 27: 205 (1972)

124 HEMKER, H.C., J.J. VELTKAMP, A. HENSEN, E.A. LOELIGER: Nature of Prothrombin Biosynthesis: Preprothrombinaemia in Vitamin K-deficiency
Nature 200: 589 (1963)

125 HEWETT-EMMETT, D., L.E. McCOY, H.I. HASSOUNA, J. REUTERBY, D.A. WALZ, W.H. SEEGERS: A partial gene duplication in the evolution of prothrombin?
Thromb. Res. 5: 421 (1974)

126 HEYSTEK, J., H.G.J. BRUMMELHUIS, H.W. KRIJNEN: Contributions to the Optimal Use of Human Blood II. The Large-Scale Preperation of Prothrombin Complex. A Comparison between Two Methods Using the Anion Exchangers DEAE-Cellulose DE 52 and DEAE-Sephadex A 50
Vox Sang. 25: 113 (1973)

127 HIMMELHOCH, S.R., E.A. PETERSON: Experimental Problems in the Use of Commercially Prepared DEAE-Cellulose for Protein Chromatography
Anal. Biochem. 17: 383 (1966)

128 HOUGIE, C.: A Simple Assay Method for Factor X (Stuart-Prower Factor)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109: 754 (1962)

129 HOUGIE, C., J.E. BROWN, P. LAKIN-THOMAS, R.A. McPHERSON, L. ARONSON, R.F. BAUGH: The Passovoy defect: Further case reports

and preliminary characterization
Thromb. Haemost. 38: 162 (1977)

130 HVATUM, M., T. HOVIG, H. PRYDZ: Studies on Tissue Thromboplastin-Electron Micrography
Thromb. Diath. haemorrh. 21: 223 (1969)

131 JACKSON, C.M.: Characterization of Two Glycoprotein Variants of Bovine Factor X and Demonstration That the Factor X Zymogen Contains Two Polypeptide Chains
Biochemistry 11: 4873 (1972)

132 JACKSON, C.M., D.J. HANAHAN: Studies on Bovine Factor X. II. Characterization of Purified Factor X. Observations on Some Alterations in Zone Electrophoretic and Chromatographic Behavior Occurring during Purification
Biochemistry 7: 4506 (1968)

133 JACKSON, C.M., T.F. JOHNSON, D.J. HANAHAN: Studies on Bovine Factor X. I. Large-Scale Purification of the Bovine Plasma Protein Possessing Factor X Activity
Biochemistry 7: 4492 (1968)

134 JAFFE, E.A., D.F. MOSHER: Synthesis of Fibronectin by cultured human endothelial cells
J. Exp. Med. 147: 1779 (1978)

135 JESTY, J., M.P. ESNOUF: The Preparation of Activated Factor X and its Action on Prothrombin
Biochem. J. 131: 791 (1973)

136 JESTY, J., Y. NEMERSON: Purification of Factor VII from Bovine Plasma
J. Biol. Chem. 249: 509 (1974)

137 JESTY, J., A.K. SPENCER, Y. NAKASHIMA, Y. NEMERSON, W. KONIGSBERG: The Activation of Coagulation Factor X
J. Biol. Chem. 250: 4497 (1975)

138 JESTY, J., A.K. SPENCER, Y. NEMERSON: The Mechanism of Activation of Factor X
J. Biol. Chem. 249: 5614 (1974)

139 JOBIN, F., M.P. ESNOUF: Coagulant Activity of Tiger Snake (Notechis scutatus scutatus) Venom
Nature 211: 873 (1966)

140 JOHNSTON, C.L., P.F. HJORT: Development of increased factor VII activity during the spontaneous coagulation of blood
J. Clin. Invest. 40: 743 (1961)

141 JOSSO, F., S. BEGUIN: The possible role of factor VII in the intrinsic system in: H. HEMKER, E. LOELIGER, J. VELTKAMP
Human blood coagulation
Biochemistry, clinical investigation and therapy
Leiden University Press Leiden (1969)

142 JOSSO, F., J. MONASTERIO DE SANCHEZ, J.M. LAVERGNE, D. MENACHE, J.P. SOULIER: Congenital Abnormality of the Prothrombin Molecule (Factor II) in Four Siblings: Prothrombin Barcelona
Blood 38: 9 (1971)

143 JÜRGENS, J.: Kongenitaler Factor VII (SPCA)-Mangel als Ursache einer hämophilieartigen hämorrhagischen Diathese
Acta haematol. 16: 181 (1956)

144 JÜRGENS, J.: Wirkung von Vitamin K_1 auf die Dicumarol-Hypoprothrombinämie und die Acceleratorfaktoren am lebergeschädigten Kaninchen und nach Leberexstirpation an der Katze
Acta. haematol. 7: 143 (1952)

145 KAHN, M.J.P., A. GOVAERTS: Prothrombin Brussels, a new congenital defective protein
Thromb. Res. 5: 141 (1974)

146 KAPLAN, A.P., K.F. AUSTEN: The fibrinolytic pathway of human plasma
J. Exp. Med. 136: 1378 (1972)

147 KASPER, C.K., B. ØSTERUD, J.Y. MINAMI, W. SHONICK, S.I. RAPAPORT: Hemophilia B: Characterization of Genetic Variants and Detection of Carriers
Blood 50: 351 (1977)

148 KISIEL, W.: Human Plasma Protein C. Isolation, characterization, and mechanism of activation by α-thrombin
J. Clin. Invest. 64: 761 (1979)

149 KISIEL, W., E.W. DAVIE: Isolation and Characterization of Bovine Factor VII
Biochemistry 14: 4928 (1975)

150 KOLLER, F., A. LOELIGER, F. DUCKERT: Experiments on a new Clotting Factor (Factor VII)
Acta Haematol. 6: 1 (1951)

151 KOSOW, D.P.: Purification and activation of human factor X: cooperative effect of Ca^{++} on the activation reaction
Thromb. Res. 9: 565 (1976)

152 KÜNZER, W.: Zur Physiologie der Blutgerinnung bei Neugeborenen
Deutsche Medizinische Wochenschrift 21: 1005 (1964)

153 LAAKE, K., R. ELLINGSEN: Purification and some characteristics of factor VII in human citrated plasma, glass-activated serum, and cold-activated plasma
Thromb. Res. 5: 539 (1974)

154 LAAKE, K., B. ÖSTERUD: Activation of purified plasma factor VII by human plasmin, plasma kallikrein, and activated components of the human intrinsic blood coagulations system
Thromb. Res. 5: 759 (1974)

155 LAAKE, K., A.M. VENNERÖD: Factor XII-induced fibrinolysis: Studies on the separation of prekallikrein, plasminogen proactivator, and factor XI in human plasma
Thromb. Res. 4: 285 (1974)

156 LAAKE, K., A.M. VENNERØD, G. HAUGEN, H. GJØNNAESS: Cold-promoted activation of factor VII in human plasma: Studies of the associated acyl-arginine esterase activity
Thromb. Res. 4: 769 (1974)

157 LANCHANTIN, G.F., J.A. FRIEDMANN, J. DeGROOT, J.W. MEHL: Preparation of Human Plasma Prothrombin and Some of Its Sedimentation Properties
J. Biol. Chem. 238: 238 (1963)

158 LANCHANTIN, G.F., J.A. FRIEDMANN, D.W. HART: The Conversion of Human Prothrombin to Thrombin by Sodium Citrate
J. Biol. Chem. 240: 3276 (1965)

159 LECHNER, K.: Immune Reactive Factor IX in Acquired Factor IX Deficiency
Thromb. Diath. haemorrh. 19: 19 (1972)

160 LECHNER, K., E. DEUTSCH: Activation of Factor X
Thromb. Diath. haemorrh. 13: 314 (1965)

161 LECHNER, K., E. DEUTSCH: Eine einfache Methode zur Herstellung von menschlichem Faktor VII-Mangelplasma
Thromb. Diath. haemorrh. 18: 252 (1967)

162 LECHNER, K.E. HARTMANN, W.H.F. SCHNEIDER, J. SPONA, K. MATT: Beeinflussung von Blutgerinnung und Fibrinolyse durch Oestrogen, Gestagen und eine Oestrogen-Gestagen-Kombination
Klin. Wochenschr. 54: 431 (1976)

163 LERNER, R.G., R. GOLDSTEIN, G. CUMMINGS: Endotoxin induced disseminated intravascular clotting: Evidence that it is mediated by neutrophil production of tissue factor
Thromb. Res. 11: 253 (1977)

164 LEVESON, J.E., M.P. ESNOUF: The Inhibition of Activated Factor X with Di:isopropyl Fluorophosphate
Brit. J. Haematol. 17: 173 (1969)

165 LEWIS, J.H., J.W. FRESH, J.H. FERGUSON: Congenital Hypoproconvertinemia
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84: 651 (1953)

166 LEWIS, M.L., A.G. WARE: A Simple Procedure for Separation of Prothrombin and Accelerator Globulin from Citrated Human Plasma
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 54: 636 (1953)

167 LINDHOUT, M.J., B.H.M. KOP-KLAASSEN, P.P.M. REEKERS, H.C. HEMKER: Demonstration of three proteins induced by vitamin K absence (PIVKAs) in the cow
J. Mol. Med. 1: 223 (1976)

168 LIU, C.Y., C.F. SCOTT, A. BAGDASARIAN, J.V. PIERCE, A.P. KAPLAN, R.W. COLMAN: Potentiation of the Function of Hagemann Factor Fragments by High Molecular Weight Kininogen
J. Clin. Invest. 60: 7 (1977)

169 LOELIGER, E.A., B. v.d. ESCH, C. Ch. ter HAAR ROMENY-WACHTER, H.L. BOOIJ: Factor VII: Its Turnover Rate and its Possible Role in Thrombogenesis
Thromb. Diath. haemorrh. 4: 196 (1960)

170 LOELIGER, E.A., B. van der ESCH, M.J. MATTERN, A.S.A. den BRABANDER: Behaviour of Factors II, VII, IX, and X during Long-Term Treatment with Coumarin
Thromb. Diath. haemorrh. 9: 74 (1963)

171 LOELIGER, E.A., A. HENSEN: Substitution Therapy in Haemophilia B
Thromb. Diath. haemorrh. 6: 391 (1961)

172 LOELIGER, A., F. KOLLER: Behaviour of Factor VII and Prothrombin in Late Pregnancy and in the Newborn
Acta haematol. 7: 157 (1952)

173 LOEW, D.,H. VINAZZER: Dose-Dependent Influence of Acetylsalicylic Acid on Platelet Funktions and Plasmatic Coagulation Factors
Haemostasis 5: 239 (1976)

174 LONG, L.A., P. LETENDRE, G. COLPRON: Hypoproconvertinêmie congénitale
Acta haematol. 13: 242 (1955)

175 MACFARLANE, R.G.: The Coagulant Action of Russell's Viper Venom; The Use of Antivenom in Defining its Reaction with a Serum Factor
Brit. J. Haematol. 7: 496 (1961)

176 MACFARLANE, F.G.: An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier
Nature 202: 498 (1964)

177 McGRATH, K.M., P.A. CASTALDI: Changes in Coagulation Factors and Platelet Function in Response to Progestational Agents
Haemostasis 4: 65 (1975)

178 McGRATH, K. M., P.A. CASTALDI: Cyclical Changes in Coagulation Factors Associated with the Use of Progestational Agents
Haemostasis 4: 73 (1975)

179 MAGNUSSON, St.: Structure and funktion of thrombin and prothrombin
Suppl. 38 ad. Thromb. Diath. haemorrh. S. 97 Stuttgart (1970)

180 MORRIS, H.R., A. DELL: Primary structure of the vitamin K-dependent part of prothrombin
FEBS Letters 44: 189 (1974)

181 MAGOON, E.H., J. SPRAGG, K.F. AUSTEN: Human Hageman Factor Dependent Pathways
Adv. Biosci. 12: 225 (1974)

182 MALHOTRA, O.P.: Purification and Properties of Normal and Abnormal Prothrombins
Suppl. 59 ad Thromb. Diath. haemorrh. S. 28 Stuttgart (1974)

183 MAMMEN, E.F., W.R. THOMAS, W.H. SEEGERS: Activation of Purified Prothrombin to Autoprothrombin I or Autoprothrombin II (Platelet Cofactor II or Autoprothrombin II-A)
Thromb. Diath. Haemorrh. 5: 218 (1960)

184 MANN, K.G., C.M. HELDEBRANT, D.N. FASS: Multiple Active Forms of Thrombin
J. Biol. Chem. 246: 6106 (1971)

185 MARDER, V.J., N.R. SHULMAN: Clinical Aspects of Congenital Factor VII Deficiency
Am. J. Med. 37: 182 (1964)

186 MATHESON, R.T., D.R. MILLER, M.-J. LACOMBE, Y.N. HAN, S. IWANAGA, H. KATO, K.D. WUEPPER: Flaujeac Factor Deficiency
J. Clin. Invest. 58: 1395 (1976)

187 MATTOCK, P., M.P. ESNOUF: A Form of Bovine Factor X with a Single Polypeptide Chain
Nature New Biol. 242: 90 (1973)

188 MAYNARD, J.R., B.E. DREYER, M.B. STEMERMAN, F.A. PITLICK: Tissue-Factor Coagulant Activity of Cultured Human Endothelial and Smooth Muscle Cells and Fibroblasts
Blood 50: 387 (1977)

189 MEIER, H.L., J.V. PIERCE, R.W. COLMAN, A.P. KAPLAN: Activation and Function of Human Hageman Factor
J. Clin. Invest. 60: 18 (1977)

190 MONTGOMERY, R.R., A. OTSUKA, W.E. HATHAWAY: Hypoprothrombinemia: Case Report
Blood 51: 299 (1978)

191 MONTIGEL, C.: Über die Wirkungsweise verschiedener Thromboplastinpräparate
Schweizerische Medizinische Wochenschrift 48: 89 (1959)

192 MORAWITZ, P.: Die Chemie der Blutgerinnung
Ergeb. Physiol. 4: 307 (1905)

193 MORRISON, S.A., M.P. ESNOUF: The Nature of the Heterogeneity of Prothrombin during Dicoumarol Therapy
Nature New Biol. 242: 92 (1973)

194 MOSHER, D.F.: Cross-Linking of Cold-insoluble Globulin by Fibrin-stabilizing Factor
J. Biol. Chem. 250: 6614 (1975)

195 MOSHER, D.F.: Action of Fibrin-stabilizing Factor on Cold-insoluble Globulin and α_2-Macroglobulin in Clotting Plasma
J. Biol. Chem. 251: 1639 (1976)

196 MÖLLER, J.: Beobachtungen zur Analyse der Lymphe, des Bluts und des Chylus: Untersuchung des Faserstoffs im gesunden und kranken Blut
Annalen der Physik und Chemie, ed. Poggendorf 25: 513 (1832)

197 MUHLFELDER, T.W., I. KAHN, J. NIEMETZ: Factors influencing the release of procoagulant-tissue factor activity from leukocytes
J. Lab. Clin. Med. 92: 65 (1978)

198 MUSTARD, J.F., H.C. ROWSELL, G.A. ROBINSON, T.D. HOEKSEMA, H.G. DOWNIE: Canine Haemophilia B (Christmas Disease)
Brit. J. Haematol. 6: 259 (1960)

199 MUSTARD, J.F., D. SECORD, T.D. HOEKSEMA, H.G. DOWNIE, H.C. ROWSELL: Canine Factor-VII Deficiency
Brit. J. Haematol. 8: 43 (1962)

200 NELSESTUEN, G.L., J.W. SUTTIE: The Purification and Properties of an Abnormal Prothrombin Protein Produced by Dicumaroltreated Cows
J. Biol. Chem. 247: 8176 (1972)

201 NELSESTUEN, G.L., T.H. ZYTKOVICZ, J.B. HOWARD: The Mode of Action of Vitamin K
J. Biol. Chem. 249: 6347 (1974)

202 NEMERSON, Y.: The Reaction between Bovine Brain Tissue Factor and Factors VII and X
Biochemistry 5: 601 (1966)

203 NEMERSON, Y.: Characteristics and Lipid Requirements of Coagulant Proteins Extracted from Lung and Brain: the Specificity of the Protein Component of Tissue Factor
J. Clin. Invest. 48: 322 (1969)

204 NEMERSON, Y., L.P. CLYNE: An assay for coagulation factor VII using factor VII-depleted bovine plasma
J. Lab. Clin. Med. 83: 301 (1974)

205 NEMERSON, Y., M.P. ESNOUF: Activation of a Proteolytic System by a Membrane Lipoprotein: Mechanism of Action of Tissue Factor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 310 (1973)

206 NEMERSON, Y., F.A. PITLOCK: Purification and Characterization of the Protein Component of Tissue Factor
Biochemistry 9: 5100 (1970)

207 NEMERSON, Y., T.H. SPAET: The Activation of Factor X by Extracts of Rabbit Brain
Blood 23: 657 (1964)

208 NOWICKI, L., K.W. SCHNEIDER, M. REIMERS: Veränderungen von Gerinnungsfaktoren unter Langzeitbehandlung mit Antikoagulantien und bei Leberzirrhosen
Blut 13: 36 (1966)

209 OEHLER, G.H. BLEYL, B. BISCHOFF, R. HENK: Vergleich von Prothrombin-Aktivität und -Konzentration bei verschiedenen Funktionszuständen der Leber
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 80: 1452 (1974)

210 OLSON, J.P., L.L. MILLER, S.T. TROUP: Synthesis of Clotting Factors by the Isolated Perfused Rat Liver
J. Clin. Invest. 45: 690 (1966)

211 VAN OOSTEROM, A.T., H. MATTIE, W.T. HERMENS, J.J. VESTKAMP: The Influence of the Thyroid Function on the Metabolic Rate of Prothrombin, Factor VII, and Factor X in the Rat
Thromb. Haemost. 35: 607 (1976)

212 ØSTERUD, B., A. BERRE, A.-B. OTNAESS, E. BJØRKLID, H. PRYDZ: Activation of the Coagulation Factor VII by Tissue Thromboplastin and Calcium
Biochemistry 11: 2853 (1972)

213 ØSTERUD, B., R. FLENGSRUD: Purification and Some Characteristics of the Coagulation Factor IX from Human Plasma
Biochem. J. 145: 469 (1975)

214 ØSTERUD, B., S.I. RAPAPORT: Synthesis of Intrinsic Factor X Activator. Inhibition of the Function of Formed Activator by Antibodies to Factor VIII and to Factor IX
Biochemistry 9: 1854 (1970)

215 OWEN, C.A., E.J.W. BOWIE: Rat Coagulation Factors V, VIII, XI, and XII: Vitamin K Dependent
Haemostasis 7: 189 (1978)

216 OWEN, W.G., C.T. ESMON, C.M. JACKSON: The Conversion of Prothrombin to Thrombin I
J. Biol. Chem. 249: 594 (1974)

217 OWREN, P.A.: Parahaemophilia, Haemorrhagic diathesis due to absence of a previously unknown clotting factor
Lancet 252: 446 (1947)

218 PAPAHADJOPOULOS, D., D.J. HANAHAN: Observations on the interaction of phospholipids and certain clotting factors in prothrombin activator formation
Biochim. Biophys. Acta 90: 436 (1964)

219 PAPAHADJOPOULOS, D., E.T. YIN, D.J. HANAHAN: Purification and Properties of Bovine Factor X: Molecular Changes During Activation
Biochemistry 3: 1931 (1964)

220 PECHET, L.: One-Stage Specific Determination of Factor II (Prothrombin) in: L. Tocantins, L. Kazal, Ed. Blood coagulation, hemorrhage and thrombosis-Methods of Study
Grune & Stratton New York (1964)

221 PETERSON, E.A.: Cellusosic Ion Exchangers in:
T.S. Work, E. Work: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology
Vol. 2 North-Holland Publishing Company-Amsterdam London (1970)

222 Pharmacia Fine Chemicals Ed.: Sephadex-Ionenaustauscher.
Leitfaden zur Ionenaustausch-Chromatographie
Uppsala (1970)

223 PITLICK, F.A., Y. NEMERSON: Binding of the Protein Component of Tissue Factor to Phospholipids
Biochemistry 9: 5105 (1970)

224 POLLER, L.: The Effect of the Use of Different Tissue Extracts on One-Stage Prothrombin Times
Acta haematol. 32: 292 (1964)

225 PRYDZ, H.: Studies on proconvertin (Factor VII). II. Purification
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1: 101 (1964)

226 PRYDZ, H.: Studies on proconvertin (Factor VII). IV. The adsorption on barium sulphate
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 16: 409 (1964)

227 PRYDZ, H.: Studies on proconvertin (Factor VII). VI. The production in rabbits of an antiserum against Factor VII
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 17: 66 (1965)

228 PRYDZ, H.: Some Characteristics of Purified Factor VII Preparations
Suppl. 84 ad Scand. J. Clin. Lab. Invest. 17: 78 (1965)

229 PRYDZ, H., A.C. ALLISON: Tissue Thromboplastin Activity of Isolated Human Monocytes
Thromb. Haemost. 39: 582 (1978)

230 PRYDZ, H., G. GAUDERNACK: Studies on the biosynthesis of factor VII (Proconvertin) The mode of action of Warfarin
Biochim. Biophys. Acta 230: 373 (1971)

231 QUICK, A.: The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice
J. Biol. Chem. 109: LXXIII (1935)

232 RADCLIFFE, R.D., P.G. BARTON: Comparisons of the Molecular Forms of Activated Bovine Factor X
J. Biol. Chem. 248: 6788 (1973)

233 RADCLIFFE, R., Y. NEMERSON: Activation and Control of Factor VII by Activated Factor X and Thrombin
J. Biol. Chem. 250: 388 (1975)

234 RADCLIFFE, R.D., Y. NEMERSON: Activation of bovine factor VII by activated factor X and thrombin
Fed. Proc. 34: 233 (1975)

235 RAPAPORT, S.I., S. SCHIFFMAN, M.J. PATCH, S.B. AMES:
The Importance of Activation of Antihemophilic Globulin and Proaccelerin by Traces of Thrombin in the Generation of Intrinsic Prothrombinase Activity
Blood 21: 221 (1963)

236 RATNOFF, O.: The Haemostatic Defects of Liver Disease in:
D. Ogston,B. Bennet Ed. Haemostasis: Biochemistry, Physiology and Pathology
J. Wiley & Sons Ltd. London (1977)

237 REEKERS, P.P.M., M.J. LINDHOUT, B.H.M. KOP-KLAASSEN, H.C. HEMKER: Demonstration of three anomalous plasma proteins induced by a vitamin K antagonist
Biochim. Biophys. Acta 317: 559 (1973)

238 REVAK, S.D., C.G. COCHRANE, J.H. GRIFFIN: The Binding and Cleavage Characteristics of Human Hageman Factor during Contact Activation
J. Clin. Invest. 59: 1167 (1977)

239 REZ, G., H. PRYDZ: The mode of action of warfarin. An intracellular precursor for Factor VII in rat liver
Biochim. Biophys. Acta 244: 495 (1971)

240 RIMON, A., B. ALEXANDER, E. KATCHALSKI: Action of Water-Insoluble Trypsin Derivatives on Prothrombin and Related Clotting Factors
Biochemistry 5: 792 (1966)

241 ROTHBERGER, H., T.S. ZIMMERMANN, J.H. VAUGHAN: Increased Production and Expression of Tissue Thromboplastin-Like Procoagulant Activity In Vitro by Allogeneically Stimulated Human Leukocytes
J. Clin. Invest. 62: 649 (1978)

242 SAITO, H.: Purification of High Molecular Weight Kininogen and the Role of This Agent in Blood Coagulation
J. Clin. Invest. 60: 584 (1977)

243 SAITO, H., O.D. RATNOFF: Alteration of factor VII activity by activated Fletcher factor (a plasma kallikrein): a potential link between the intrinsic and extrinsic blood-clotting systems
J. Lab. Clin. Med. 85: 406 (1975)

244 SCHIFFMAN, S., F. MARKLAND, jr.: Effect of intermediates of extrinsic clotting on purified Factor XI: Factor VII and/or thromboplastin
Thromb. Res. 6: 273 (1975)

245 SCHIFFMAN, S., R. PECCI, P. LEE: Contact activation of factor XI: evidence that the primary role of contact activation cofactor (CAC) is to facilitate the activation of factor XII
Thromb. Res. 1: 319 (1977)

246 SCHMIDT, A.: Die Lehre von den fermentativen Gerinnungserscheinungen in den eiweissartigen thierischen Körperflüssigkeiten
C. Mattiesen Dorpat (1876)

247 SCHRÖER, H.: Diskussionsbemerkung in: Suppl. 2 ad Thromb. Diath. haemorrh. S. 134 Stuttgart (1963)

248 SCHRÖER, H.: Bestimmung der Faktoren Prothrombin, Prothrombinverbrauch, Faktor V, Faktor VII, Faktor X
Ärztl. Lab. 14: 316 (1968)

249 SCHROGIE, J.J., H.M. SOLOMON, P.D. ZIEVER: Effect of oral contraceptives on vitamin K-dependent clotting activity
Clin. Pharmacol. Ther. 8: 670 (1967)

250 SEEGERS, W.H.: Activation of Purified Prothrombin
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 72: 677 (1949)

251 SEEGERS, W.: Prothrombin
Harvard University Press Cambridge 1962

252 SEEGERS, W.: Enzyme theory of blood clotting
Fed. Proc. 23: 749 (1964)

253 SEEGERS, W., H.I. HASSOUNA, E. NOVOA: Immunological Aspects of some Vitamin K-Dependent factors and preparation of depleted plasmas
Thromb. Res. 11: 633 (1977)

254 SEEGERS, W.H., L.E. McCOY, J. REUTERBY, N. SAKURAGAWA, G. MURANO, B.B.L. AGRAWAL: Further observations on the purification and properties of autoprothrombin III (Factor X)
Thromb. Res. 1: 209 (1972)

255 SELIGSOHN, U., M.R. PEYSER, R. TOAFF, M. SHANI, B. RAMOT: Severe Hereditary Deficiency of Factor VII during Pregnancy
Thromb. Diath. haemorrh. 24: 146 (1970)

256 SHANBERGE, J.N., T. MATSUOKA: Studies Regarding the Effect of Foreign-Surface Contact on the One-Stage Prothombin Time Determination
Thromb. Diath. haemorrh. 15: 442 (1966)

257 SHAPIRO, S.S., J. MARTINEZ: Human Prothrombin Metabolism in Normal Man and in Hypocoagulable Subjects
J. Clin. Invest. 48: 1292 (1969)

258 SHAPIRO, S.S., J. MARTINEZ, R.R. HOLBURN: Congenital Dysprothrombinemia: an Inherited Structural Disorder of Human Prothrombin
J. Clin. Invest. 48: 2251 (1969)

259 SHAW, S., G.D. PEGRUM, C.P. FARHTING, S. WOLFF: Assessment of Factor VII and Factor X
Thromb. Diath. haemorrh. 15: 294 (1966)

260 SISE, H.S., S.M. LAVELLE, R. BECKER: A Method for Assay of Stuart Factor
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96: 662 (1957)

261 SOULIER, J.-P., O. PROU-WARTELLE: New Data on Hageman Factor and Plasma Thromboplastin Antecedent: The Role of 'Contact' in the Initial Phase of Blood Coagulation
Brit. J. Haematol. 6: 88 (1960)

262 SPURLING, N.W., L.D. BURTON, R. PEACOCK, T. PILLING: Hereditary Factor-VII Deficiency in the Beagle
Brit. J. Haematol. 23: 59 (1972)

263 SPURLING, N.W., J. SAVORY: The Influence of Residual Factor VII on the Sensitivity of Brain Thromboplastin
Thromb. Haemost. 39: 592 (1978)

264 STENFLO, J.: Vitamin K and the Biosynthesis of Prothrombin
II. Structural comparison of normal and dicoumarol-induced bovine prothrombin
J. Biol. Chem. 247: 8167 (1972)

265 STENFLO, J.: Vitamin K and the Biosynthesis of Prothrombin
IV. Isolation of peptides containing prosthetic groups from normal prothrombin and the corresponding peptides from dicoumarol-induced prothrombin
J. Biol. Chem. 249: 5527 (1974)

266 STENFLO, J., P. FERNLUND, W. EGAN, P. ROEPSTORFF: Vitamin K Dependent Modifications of Glutamic Acid Residues in Prothrombin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 2730 (1974)

267 STENFLO, J., P.-O. GANROT: Vitamin K and the Biosynthesis of Prothrombin I. Identification and purification of a dicoumarol-induced abnormal prothrombin from bovine plasma
J. Biol. Chem. 247: 8160 (1972)

268 STENN, K.S., E.R. BLOUT: Mechanism of Bovine Prothrombin Activation by an Insoluble Preparation of Bovine Factor X (Thrombokinase)
Biochemistry 11: 4502 (1972)

269 SUOMELA, H.: Human Coagulation Factor IX
Eur. J. Biochem. 71: 145 (1976)

270 SUOMELA, H., M. BLOMBÄCK, B. BLOMBÄCK: The activation of factor X evaluated by using synthetic substrates
Thromb. Res. 1: 267 (1977)

271 SUTTIE, J.W.: Control of Prothrombin and Factor VII Biosynthesis by Vitamin K
Arch. Biochem. Biophys. 118: 166 (1967)

272 SVENDSEN, L.B. BLOMBÄCK, M. BLOMBÄCK, P.I. OLSSON: Synthetic chromogenic substrates for determination of trypsin, thrombin and thrombin-like enzymes
Thromb. Res. 1: 267 (1972)

273 SVENDSEN, L., K. STOCKER: Die Bestimmung von Protease-Aktivitäten mit gezielt konstruierten Peptid-Nitroanilid-Derivaten
in: I. Witt Ed. Neue Methoden der Gerinnungsanalyse mit chromogenen Substraten S. 23
Walter de Gruyter Berlin (1977)

274 SWART, A.C.W., B.H.M. KLAASSEN, C.H.F. BLOYS-VAN Treslong -DE GROOT, H.C. HEMKER: The Adsorption of Blood Coagulation Factors II, VII, IX and X from Human Plasma to Aluminium Hydroxide
Thromb. Diath. haemorrh. 27: 490 (1972)

275 TELFER, T.P., K.W. DENSON, D.R. WRIGHT: A "New" Coagulation Defect
Brit. J. Haematol. 2: 308 (1956)

276 THOMPSON, R.E., R. MANDLE, A.P. KAPLAN: Association of Factor XI and High Molecular Weight Kininogen in Human Plasma
J. Clin. Invest. 60: 1376 (1977)

277 TISHKOFF, G.H., L.C. WILLIAMS, D.M. BROWN: Preparation of Highly Purified Prothrombin Complex
J. Biol. Chem. 243: 4151 (1968)

278 TITANI, K., K. FUJIKAWA, D.L. ENFIELD, L.H. ERICSSON, K.A. WALSH, H. NEURATH: Bovine factor X (stuart factor): Amino-acid sequence of heavy chain
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3082 (1975)

279 TITANI, K., M.A. HERMODSON, K. FUJIKAWA, L.H. ERICSSON, K.A. WALSH, H. NEURATH, E.W. DAVIE: Bovine Factor X_a (Activated Stuart Factor). Evidence of Homology with Mammalian Serine Proteases
Biochemistry 11: 4899 (1972)

280 VARADI, K., H.C. HEMKER: Kinetics of the formation of the factor X activating enzyme of the blood coagulation system
Thromb. Res. 8: 303 (1976)

281 VELTKAMP, J.J., E.F. DRION, E.A. LOELIGER: Detection of the Carrier State in Hereditary Coagulation Disorders I
Thromb. Diath. haemorrh. 19: 299 (1968)

282 VENNERÖD, A.M., K. LAAKE: Prekallikrein and plasminogen proactivator: Absence of plasminogen proactivator in Fletcher Factor deficient plasma
Thromb. Res. 8: 519 (1976)

283 VERMEER, C., B.A.M. SOUTE, H.C. HEMKER: A new method for the preparation of artificial factor II reagents from normal human and bovine plasma
Thromb. Res. 10: 495 (1977)

284 VERSTRAETE, M., P.A. CLARK, I.S. WRIGHT: Use of Different Tissue Thromboplastins in the Control of Anticoagulant Therapy
Circulation 16: 213 (1957)

285 VERSTRAETE, M., P.A. CLARK, I.S. WRIGHT: Evaluation of Prothrombin Times Performed with Different Thromboplastins
Acta Med. Scand. 163 : 105 (1959)

286 VIRCHOW, R.: Ueber den Faserstoff: V. Ueber den Ursprung des Faserstoffs und die Ursache seiner Gerinnung aus den thierischen Flüssigkeiten in: R. Virchow: Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin S. 104
Meidinger Sohn & Comp. Frankfurt a.M. (1856)

287 VOSS, D.: Das Verhalten der Faktoren des "Prothrombin-Komplexes" bei der Säulenchromatographie an Anionenaustauschern
Blut 15: 214 (1967)

288 VOSS, D., B.A. WAALER: Congenital Hypoproconvertinemia
A Report on 12 Cases with Total Deficiency and 19 Cases with Partial Deficiency
Thromb. Diath. haemorrh. 3: 375 (1959)

289 de VRIES, A., B. ALEXANDER, R. GOLDSTEIN: A factor in serum which accelerates the conversion of prothrombin to thrombin:
I. Its determination and some physiologic and biochemical properties
Blood 4: 247 (1949)

290 de VRIES, S.I., H.K. KETTENBORG, E.T. van der POL: Hamorrhagic Diathesis due to a Deficiency of Factor VII (Hypoproconvertinaemia)
Acta haemat. 14: 43 (1955)

291 WARE, A.G., W.H. SEEGERS: Two-stage procedure for the quantitative determination of prothrombin concentration
Am. J. Clin. Pathol. 19: 471 (1949)

292 WEISS, A.S., J.I. GALLIN, A.P. KAPLAN: Fletcher Factor Deficiency: A diminished rate of Hageman factor activation caused by absence of prekallikrein with abnormalities of coagulation, fibrinolysis, chemotactic activity and kinin generation
J. Clin. Invest. 53: 622 (1974)

293 WICKERSHAUSER, M., J.T. SGOURIS: Development of Large-Scale Fractionation Methods II. Isolation of a Factor IX Concentrate (Prothrombin Complex) for Clinical Use
Vox Sang . 22: 137 (1972)

294 WILLIAMS, W.J., D.G. NORRIS: Purification of a Bovine Plasma Protein (Factor VII) Which Is Required for the Activity of Lung Microsomes in Blood Coagulation
J. Biol. Chem. 241: 1847 (1966)

295 GIROLAMI, A., R. DAL BO ZANON, F. FABRIS, R. FRANZOSO: Combined Factor VII and Factor VIII Deficiency Due to a Casual Association of Heterozygosis for Factor VII Deficiency and Hemophilia A
Acta haematol. 58: 246 (1977)

296 QUICK, A.J.: Current Blood Clotting Schemes
Thromb. Diath. Haemorrh. 16: 318 (1966)

297 OWREN, P., C. BJERKELUND: A new, previously unknown clotting factor
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1: 162 (1949)

298 REVAK, S., C. COCHRANE, B. BOUMA, J. GRIFFIN: Surface and fluid phase activities of two forms of activated Hageman factor produced during contact activation of plasma
J. Exp. Med. 147: 719 (1978)

Herrn Prof. Dr. med. H. Beeser danke ich für die Überlassung des Themas, für die vielfältigen Anregungen und ganz besonders für seine Ermutigung, als die Versuche zunächst nur negative Ergebnisse zu erbringen schienen.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. H. Egli für die Möglichkeit, die Untersuchungen in seinem Institut durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. med. K. Schander danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Lebenslauf

Am 4.6.1952 wurde ich, Rupprecht Willibald Kulzer, als Sohn des Dr. jur. Gerhard Kulzer und seiner Ehefrau Emmi, geb. Schreiner, in München geboren.

Infolge einer Versetzung meines Vaters übersiedelten wir 1954 nach Bonn. Hier besuchte ich von 1959 - 1963 die Grundschule, von 1963 an den altsprachlichen Zweig des Staatlichen Beethoven-Gymnasiums. 1971 legte ich am Beethoven-Gymnasium die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1971/72 begann ich das Studium der Medizin an der Ruhr-Universität Bochum, das ich ab Sommersemester '72 an der Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität Bonn fortsetzte. Hier legte ich im Herbst '72 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im Herbst '73 die ärztliche Vorprüfung, im Sommer '74 den ersten Abschnitt und im Frühjahr '77 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.

Die Ausbildung während des Praktischen Jahres erhielt ich von April 1977 an bis März 1978 am Malteser-Krankenhaus in Bonn, in der Abteilung für Innere Medizin unter Leitung von Prof. Dr. F. J. Kessler, in der Abteilung für Chirurgie unter Leitung von Dr. G. Hoppe und in der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin unter Leitung von Dr. K. Franicevic.

Den dritten und letzten Abschnitt der ärztlichen Prüfung legte ich im April 1978 ab.

Seit Herbst 1978 arbeite ich am Institut für Experimentelle Hämatologie und Bluttransfusionswesen der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. med. H. Egli).